

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biochemie



Mgr. Zuzana Novotná

Enzymatický systém anaerobních hub
Enzymatic system of anaerobic rumen fungi

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Fliegerová, CSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Děkuji Ing. Janu Kopečnému, DrSc. za zadání zajímavého tématu a umožnění vypracování této dizertační práce na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., v laboratoři anaerobní mikrobiologie.

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Fliegerové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a laskavý a profesionální přístup při vypracovávání této dizertační práce.

Dále velice děkuji Ing. Lence Štrosové a Ing. Jakubovi Mrázkovi, PhD. za spolupráci na této dizertační práci, za ochotu a všestrannou pomoc a samozřejmě děkuji i celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ABSTRACT.....	10
ABSTRAKT	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Bachorové prostředí přežvýkavců	14
1.1.1 Mikroorganismy v bachoru přežvýkavců	14
1.2 Bachorové anaerobní houby.....	15
1.2.1 Taxonomické zařazení anaerobních bachorových hub	15
1.2.2 Životní cyklus anaerobních bachorových hub	17
1.2.3 Metabolismus hexosy	18
1.2.4 Enzymy degradující rostlinnou biomasu	20
1.3 Chytilolytické enzymy	24
1.3.1 Úvod	24
1.3.2 Chitin	25
1.3.3 Chitinasy	26
1.4 Xylanolytické enzymy.....	27
1.4.1 Úvod.....	27
1.4.2 Xylan.....	27
1.4.3 Xylanolytické enzymy.....	28
1.4.4 Kooperace xylanolytického systému.....	32
1.4.5 Využití xylanasy.....	34
1.4.6 Aplikace.....	35
1.5 Známé sekvence hydrol. enzymů u bachorových hub.....	37
1.6 Závěr	43
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	44
3. MATERIÁL A METODY	45

3.1 Použitý materiál.....	45
3.2 Použité přístroje	45
3.3 Izolace a kultivace	46
3.3.1 Transport tráveniny pro izolaci bachorových hub	46
3.3.2 Izolace a uchovávání čistých kultur hub	46
3.3.3 Molekulárně-genetická analýza 18S rDNA.....	47
3.3.4 Kultivační techniky a živná média	48
3.4 Metody stanovení enzymatických aktivit	52
3.4.1 Stanovení endochitinasové, celulasové, xylanasové, amylasové, endoglukanasové, laminarinasové, pektinhydrolasové a α -glukuronidasové aktivity	52
3.4.2 Stanovení N-acetylglukosaminidasové, α -xylosidasové, β -xylosidasové, α -glukosidasové, β -glukosidasové, mannosidasové, cellobiohydrolasové, acetylxylan esterasové, arabinasové a β -galaktosidasové aktivity	53
3.4.3 Stanovení exochitinasové aktivity.....	55
3.4.4 Stanovení deacetylasové aktivity	56
3.4.5 Stanovení aktivity proteas	57
3.4.6 Stanovení lipasové aktivity.....	58
3.4.7 Stanovení pektatlyasové aktivity.....	59
3.4.8 Stanovení aktivity esterasy kyseliny ferulové a kumarové	60
3.4.9 Stanovení bílkovin metodou Bradforda.....	61
3.4.10 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu	61
3.4.10.1 SDS PAGE ELEKTROFORÉZA.....	62
3.4.10.2 BARVENÍ EL. GELU STŘÍBREM NEBO COO. BLUE R-250 .	63
3.4.10.3 ZYMOGRAM	63
3.4.10.4 Příprava CM-chitinu a CM-xylanu.....	64
3.4.11 Charakterizace enzymu.....	64
3.4.11.1 Stanovení optimální pH	64
3.4.11.2 Stanovení stability enzymu při různém pH.....	64
3.4.11.3 Stanovení teplotního optima.....	65
3.4.11.4 Stanovení teplotní stability enzymu	65
3.4.11.5 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu enzymu	65

3.4.11.6 Substrátová specifita.....	65
3.5 Čištění proteinů pomocí ultraf. cely a gel. chromatografie	66
3.6 Fylogenetická analýza endoxylanasy anaerobní houby KF8 .	67
3.7 Popis nové houby	67
3.7.1 Mikroskopické pozorování.....	67
3.7.2. Stanovení koncových metabolitů	68
3.7.3. Stanovení složení mastných kyselin v buněčné stěně	69
3.7.4. Sekvenční analýza úseků ribozomální DNA	69
4. VÝSLEDKY	70
4.1 Screening hydrolytických enzymů.....	70
4.2 Chitinolytický komplex.....	72
4.3 Charakterizace endochitinasy	73
4.3.1 Teplotní optimum a teplotní stabilita	73
4.3.2 pH optimum a pH stabilita.....	74
4.3.3 Substrátová specifita.....	75
4.3.4 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinasy	76
4.4 Xylanolytický systém	78
4.4.1 Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u anaerobních hub	78
4.4.2 Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na zdroji uhlíku v médiu.....	80
4.4.3 Isoformy endoxylanasy a xylosidasy	87
4.4.4 Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na buněčné frakci...	88
4.4.5 Xylanolytický komplex	89
4.4.6 Frakcionace endoxylanasy pomocí SEPHADEXU G-100 a analýza MALDI-TOF	91
4.4.7 Fylogenetická analýza endoxylanasy houby KF8.....	93
4.5 Popis nové houby KF9	101
4.5.1 Mikroskopické pozorování a morfologický popis.....	101
4.5.2 Sekvenční analýza úseků ribozomální DNA.....	107
4.5.3 Koncové metabolity.....	109
4.5.4 Složení mastných kyselin v buněčné stěně.....	110
5. DISKUSE.....	112

6. ZÁVĚR.....	118
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	120

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	aktivita enzymu
a	koncentrace substrátu
a ₁	směrnice přímky kalibrace
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CM-	karboxymethylovaný
CoA	Koenzym A
DAPI	4',6' diamidino-2-phyindol
DDD chitin	demineralizovaný, deproteinovaný, depigmentovaný a delipidovaný chitin
D-GLU	D-glukosamin
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
Endo	endochitinasová aktivita
fNAG	faktor přepočítaný z kalibrace pro N-acetyl-D- glukosaminové zbytky
fPNP	faktor přepočítaný z kalibrace pro P-nitrophenylové zbytky
Gal	galaktosa
GLcNAc	N-acetylglukosaminové jednotky
Glc, D-GLU	glukosa
HPLC	kapalinová chromatografie
M10	označení média používaného pro pěstování anaerobních bachorových hub
M2	syntetické médium pro pěstování hub
MBH	3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon
MC-	mikrokrystalický
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonová kyselina
MW	molekulová hmotnost
N-ac	N-acetylglukosaminidasová aktivita

NAD ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADH.....	redukována forma nikotinamidadeninukleotidu
NADPH.....	redukována forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NAG.....	N-acetyl-D-glukosaminové zbytky
ONP	o-nitrofenylový zbytek
PAHBAH	čínidlo z hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny, HCl a NaOH
PCR.....	polymerázová řetězová reakce
PNP.....	P-nitrophenylovaný zbytek
POHBAH	čínidlo z hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny a HCl
SDS.....	dodecylsírán sodný
SDS PAGE elektroforéza.....	dělení proteinů dle molekulové hmotnosti
Temed	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
Thimerosal	Merkury-[(o-carboxyphenyl)thio]-ethyl sodium salt
TMK	těkavé mastné kyseliny
Trizma.....	trizma báze, tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	uridindifosfát
XYL.....	xylosa

Abstract

Anaerobic fungi inhabiting the digestive tract of large herbivores secrete a variety of hydrolytic enzymes, including cellulases, xylanases, mannases, esterases, glucosidases, and glucanases, which effectively hydrolyze plant biomass consisting mainly of cellulose and hemicellulose, the most abundant polysaccharides in the biosphere. The immense progress has been achieved in investigation of *Neocallimastix*, *Piromyces*, however other genera are less studied. This work therefore concentrated the effort to analyze the hydrolytic system of genera *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomyces* and fungus KF9 described as new type of fungus belonging to the genus *Piromyces*. The studied anaerobic fungi grown in batch culture on M10 medium with rumen fluid and microcrystalline cellulose as carbon source produced a broad range of enzymes requisite for degradation of plant structural and storage carbohydrates including cellulase, endoglucanase, xylanase, α -xylosidase, β -xylosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -galactosidase, mannosidase, cellobiohydrolase, amylase, laminarinase, pectinase and pectate lyase. These enzymes were detected in both the intra- and extra-cellular fractions, but production into the medium was prevalent with exception for intracellular β -xylosidase, chitinases, N-acetylglucosaminidase, and lipase. Xylanase activity was predominant among the polysaccharide hydrolases. Xylanolytic enzymes were therefore studied in detail.

Activity of endoxylanase and xylosidase of studied rumen fungi *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomyces* and new fungus KF9 were the highest in 4-7 days after inoculation and were produced on all studied carbon sources (glucose, cellobiose, phospho-cellulose, mc-cellulose, xylose, hemicellulose, cellulose, cm-cellulose, cm-xylan, starch, lactose, arabinose and xylan). Activities of endoxylanase and β -xylosidase were detected in 6 different cell fractions including medium (extracellular), cell wall, hydrogenosome, lysosome, microsomal and cytosolic fraction. In general, endoxylanase was secreted into the culture medium while β -xylosidase was associated with fungal cells and cytosolic fraction. Endoxylanases of studied rumen fungi exhibited several isoformes of xylanases with approximate molecular weights ranging from 22 to 146 kDa. Xylosidases exhibited 2 isoforms with molecular weight 39 and 89 kDa. Endoxylanase and xylosidase of rumen fungus KF8 of genera *Anaeromyces* was purified using SEPHADEX G-100. While xylosidase was found to produce only one expressive peak, the endoxylanase produced several similar peaks. Xylanases of strains of *Anaeromyces* and *Orpinomyces* have been subjected to phylogenetic analysis. Randomized Accelerated Maximum Likelihood phylogenetic analysis resulted in tree, where xylanase

sequences of *Anaeromyces* and *Orpinomyces* grouped well together with GenBank sequences derived from *Neocallimastix* and *Piromyces* sp. creating monophyletic group of xylanases of anaerobic fungi. On the other hand, inside this group, *Orpinomyces* and *Anaeromyces* xylanase sequences grouped separately and both formed sister clade of mixed *Neocallimastix* and *Piromyces* xylanase clade. Surprisingly xylanases of anaerobic fungi are more similar to bacterial xylanases (clade of clostridia and bacilly) then fungal xylanases (clade of dikarya), which indicates the possible horizontal gene transfer between rumen bacteria and rumen anaerobic fungi.

The increase attention was further paid to chitinolytic system of anaerobic polycentric rumen fungi of genera *Orpinomyces* and *Anaeromyces*. Activities of four chitin splitting enzymes including endochitinase, exochitinase, N-acetylglucosaminidase and deacetylase were studied in three crude enzyme fractions- extracellular, cytosolic and cell wall fraction. Endochitinase was found as a dominant enzyme with highest activity in cytosolic fraction. Endochitinases of both genera were stable from pH 4.5 to 7 with optimal pH 6.5. *Orpinomyces* endochitinase was stable up to 50 °C with optimal temperature 50 °C, while *Anaeromyces* endochitinase was stable up to 40 °C with optimal temperature also 40 °C. The most suitable substrate for both endochitinases was fungal cell wall chitin. Enzyme activities were inhibited by Hg²⁺ ions and activated by Mg²⁺ ions. Both endochitinases were inhibited by 10 mM SDS and activated by iodacetamide.

The last part of this work is devoted to description of new fungus KF9. This fungus with monocentric thallus was isolated from cattle rumen fluid. Strain KF9 was willing to produce sporangia of very different shapes: globular (average 25 až 70 µm), bifurcated or elongated (size 20-25 x 50-100 µm). On some sporanga the separation from the flexuous sporangiophore by septum was visible. The nuclei of thalli were indicated in sporangia and sporangiophores. The whole mycelium except sporangia is composed of branched narrow hyphae with many stolons. Uninucleate and polyflagellate (3-12 flagella, 30-40 µm, posteriorly orientated) zoospores is elipsoidal or globular (average 7-12 µm). The main end products of the strain KF9 was found to be acetate. Sequence analysis of ITS1 fragment of rDNA indicated that this strain belong to genus *Piromyces*, however represents a new type. Probably new species, which has to be described.

Abstrakt

Anaerobní houby, které osidlují zažívací trakt přežvýkavců a velkých býložravců, produkují řadu hydrolytických enzymů, včetně celulas, xylanasy, mannanasy, esterasy, glukosidas a glukanas, které účinně hydrolyzují rostlinnou biomasu. Ta se skládá především z celulosy a hemicelulosy, v biosféře nejvíce zastoupených polysacharidů. Mezi nejlépe prostudované anaerobní houby patří rody *Neocallimastix* a *Piromyces*, ostatní rody jsou studovány méně. Tato práce se proto soustředila na hydrolytický systém hub rodů *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomyces* a houby KF9, která je popsána jako nový druh houby patřící do rodu *Piromyces*. V této práci bylo potvrzeno, že anaerobní houby, pěstované v médiu M10 obohaceném bacherovou tekutinou a mikrokrystalickou celulosou jako zdrojem uhlíku, produkují celou řadu enzymů potřebných pro rozklad rostlinných strukturálních a zásobních sacharidů, jako celulasu, endoglukanasu, xylanasu, α -xylosidasu, β -xylosidasu, α -glukosidasu, β -glukosidasu, β -galaktosidasu, mannosidasu, cellobiohydrolasu, amylasu, laminarinasu, pektinasu a pektatylasu. Tyto enzymy byly produkovány jak v intra- tak v extracelulární frakci, ale převážně byly uvolňovány do extracelulární frakce s výjimkou β -xylosidasy, chitinasy, N-acetylglukosaminidasy a lipasy. Aktivita xylanasy byla dominantní mezi ostatními hydrolasami, proto byl xylanolytický systém studován detailněji.

Aktivita endoxylanasy a xylosidasy u anaerobních bacherových hub rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomyces* a nové houby KF9 dosahovala nejvyšších hodnot 4.-7. den kultivace a oba enzymy byly produkovány na všech studovaných zdrojích uhlíku (glukosa, cellobiosa, fosfo-celulosa, mc-celulosa, xylosa, hemicelulosa, celulosa, cm-celulosa, cm-xylan, škrob, laktosa, arabinosa a xylan). Aktivita endoxylanasy a β -xylosidasy byla sledována v 6 různých buněčných frakcích (frakce z buněčných stěn, hydrogenosomální frakce, lysozomová frakce, mikrosomální frakce a cytosolová frakce) včetně média (extracelulární frakce). Obecně platí, že endoxylanasa je vylučována do kultivačního média, zatímco β -xylosidasa je spojena s buněčnou stěnou a cytosolovou frakcí. Endoxylanasy studovaných bacherových hub vykazovaly několik isoform s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 22 až 146 kDa. Xylosidasy tvoří 2 isoformy s molekulovou hmotností 39 a 89 kDa. Endoxylanasa a xylosidasa anaerobní bacherové houby KF8 rodu *Anaeromyces* byla čištěna pomocí Sephadexu G-100. Zatímco u xylosidasy bylo zjištěno, že vytváří jen jeden výrazný pík, endoxylanasa produkovala několik podobných píků. Xylanasa anaerobních hub kmenů *Anaeromyces* a *Orpinomyces* byla podrobena fylogenetické analýze. Z výsledků RaxML-HPC (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) fylogenetické analýzy vyplývá, že sekvence

xylanasy hub rodu *Anaeromyces* a *Orpinomyces* tvoří jednu skupinu s GenBank sekvencemi xylanasy hub rodu *Neocallimastix* a *Piromyces* sp. a vytvářejí monofyletickou skupinu xylanasy anaerobních hub. Uvnitř této monofyletické skupiny však sekvence xylanasy jak rodu *Orpinomyces*, tak rodu *Anaeromyces* vytvářejí samostatné větve, i když spadají do stejného klastru jako xylanasy rodu *Neocallimastix* a *Piromyces*. Xylanasy anaerobních hub jsou překvapivě více podobné bakteriálním xylanasám (klastr klostridií a bakterie *Bacillus*) nežli xylanasám plísní (klastr *Dikaryi*), což ukazuje na možný horizontální přenos genů mezi bakteriemi a anaerobními houbami v bachoru.

Dále byl studován chitinolytický systém anaerobních polycentrických bachorových hub rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*. Aktivita čtyř chitin degradujících enzymů - endochitinasy, exochitinasy, N-acetylglukosaminidasy a deacetylasy- byly zkoumány ve třech frakcích: extracelulární, cytosolová a frakce z buněčné stěny. Endochitinasa se projevila jako dominantní enzym s největší aktivitou v cytosolové frakci. Endochitinasy u obou rodů jsou stabilní v rozmezí pH 4,5 - 7 s optimálním pH 6,5. Endochitinasa rodu *Orpinomyces* byla stabilní až do 50°C s optimální teplotou 50°C, zatímco endochitinasa rodu *Anaeromyces* byla stabilní do 40°C s optimální teplotou 40°C. Nejvhodnějším substrátem pro endochitinasu byl shledán chitin připravený z buněčných stěn hub, což je logický výsledek. Enzymatická aktivita endochitinasy byla inhibována ionty Hg^{2+} a aktivována ionty Mg^{2+} . Obě endochitinasy byly inhibovány 10mM SDS a aktivovány iodacetamidem.

Poslední část této práce je věnována popisu nové houby KF9. Tato monocentrická houba byla izolována z kravské bachorové tekutiny. Kmen KF9 produkoval sporangia velmi různých tvarů: kulové (průměr 25 až 70 μm), rozdvojené nebo podlouhlé (velikost 20-25 x 50-100 μm). Některá sporangia jsou oddělena od sporangiophoru basálním septem. Jádra v myceliu byla lokalizována ve sporangiiích a sporangiophorech. Celé mycelium kromě sporangia se skládá z úzkých rozvětvených hyf s mnoha oddenky. Jednojaderné polyflagelární (3-12 bičíků dlouhých 30-40 μm orientovaných vzadu) zoospory jsou elipsoidní až kulovité (v průměru 7-12 μm). Mezi hlavní konečné produkty kmene KF9 patří acetát. Sekvenční analýza ITS1 fragmentu rDNA ukázala, že tento kmen patří k rodu *Piromyces*, avšak představuje nový typ. Pravděpodobně nový druh, který musí být popsán.

1. TEORETICKÁ ČÁST

Býložraví přežvýkavci jsou skupinou savců, pro kterou je složení krmiv velice důležité, neboť nejsou schopni pomocí vlastních enzymů štěpit strukturalní polysacharidy rostlinné tkáně ^[96]. K rozkladu krmiva využívají symbiotického vztahu s mikroorganismy, bakteriemi, prvoky a houbami, které osidlují předžaludek. Bachorový ekosystém je proto předmětem intenzivního studia již více než sto let. Zájem o něj neklesá ani v současnosti vzhledem ke snaze o co nejlepší využití a regulaci jedinečné schopnosti přežvýkavců produkovat živočišnou bílkovinu z rostlinné biomasy.

1.1 Bachorové prostředí přežvýkavců

Býložravci konzumují rostlinnou biomasu s vysokým obsahem strukturálních polysacharidů (hlavně celulosy, hemicelulosy a pektinu), které jsou pro ostatní živočichy málo stravitelné nebo nestravitelné. Tyto polysacharidy jsou štěpeny mikroorganismy, které osidlují trávicí trakt svého hostitele a vzniká tak symbiotický vztah prospěšný pro oba subjekty. Na vrcholu evolučního stromu býložravců stojí přežvýkavci, u kterých se v trávicím traktu vytvořil segmentovaný předžaludek složený z bachoru, knihy a čepce. Bachor je největší ze tří částí předžaludku. Jeho objem je u dospělého dobytka 100-120 litrů. Nachází se v levé polovině břišní dutiny a leží mezi bránicí a pánví. Je tvořen dvěma nad sebou uloženými vaky, které jsou oddělené podélnými brázdami ^[96].

Komory předžaludku mají charakter fermentorů s diskontinuálním dávkováním krmiva a vytvářejí tak ideální prostředí pro fermentující mikroorganismy. Pro bachor je typická teplota 39-40°C. Při intenzivní fermentaci může vystoupit až na 41°C, naopak po požití většího množství vody poklesne o 5-10°C. Hodnota pH je 6-7 a redoxní potenciál je výrazně záporný (-150 až -300 mV), což je způsobeno fermentační činností mikroorganismů. Bachorový plyn obsahuje především CO₂ (40-80 %), metan (20-40 %), dusík (3-15 %) a vodík (1- 5%) ^[126].

1.1.1 Mikroorganismy v bachoru přežvýkavců

V běžné bachorové populaci se vyskytují hlavně bakterie, prvoci a houby. Tyto mikroorganismy se v trávicím traktu vyskytují přichycené na částech potravy, adherované

na epitel stěny žaludku nebo volně pohyblivé v bachorové tekutině ^[43]. Nejpočetněji jsou zastoupeny bakterie ^[126]. V bachoru se mohou vyskytovat i kvasinky a plísně, které se tam dostaly s kontaminovaným krmivem ^[126].

O přenosu mikroflóry z matky na mládě existuje dosud málo informací, avšak předpokládá se, že ke kolonizaci dochází prostřednictvím slin přímo mezi dvěma zvířaty nebo nepřímo přes aerosoly, krmivem a pitím společné vody ^[56, 88].

1.2 Bachorové anaerobní houby

Bachorové houby jsou jediné dosud popsané striktně anaerobní nižší houby, jejichž existence byla mikrobiologům dlouho utajena. Motilní zoospory hub byly v bachorovém obsahu pozorovány již v roce 1910 ^[203], ale vědci je mylně považovali za zástupce prvoků ^[126]. Také názor J.W. Fostera formulovaný v roce 1949, který tvrdil, že nemohou existovat anaerobní houby a nemohou metabolizovat karbohydráty anaerobním kvašením ^[126], byl jednou z příčin pozdního objevu anaerobních hub. Až v roce 1974 vyslovil Orpin ^[132] pochybnosti o tom, zda se skutečně jedná o prvoka. V dalších studiích Orpin ^[133] odhalil, že domnělý prvok je ve skutečnosti pohyblivé generativní stadium (tj. zoospora) nižších hub. Výzkum buněčné stěny těchto organismů prokázal přítomnost chitinu ^[137] a chitinsyntetasy ^[31], což byl konečný důkaz toho, že tyto mikroorganismy patří mezi nižší houby ^[126]. První izoláty byly provedeny ve Velké Británii z ovce ^[133], u nás poprvé izolovala anaerobní houby Novozámská z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v roce 1987. Jakmile se zjistilo, že lze houby izolovat i z trusu zvířat ^[112,121], byly popsány houby u celé řady býložravců, jak přežvýkavých, tak nepřežvýkavých, jako je např. slon ^[191]. Naopak ze zažívacího traktu býložravců s rychlým obratem jako je např. králík nebo vačice ^[12] nebyly anaerobní houby dosud izolovány.

1.2.1 Taxonomické zařazení anaerobních bachorových hub

Současný taxonomický systém anaerobních hub byl vytvořen na základě morfologických kritérií. Jednotlivé rody jsou definovány na základě monocentrické (mají jedno centrum reprodukce) či polycentrické stélky (mají mnoho center rozmnožování) ^[9], bulbózních či vláknitých kořínků mycelia a počtu bičíků u zoospor. Určení druhů anaerobních hub se opírá o ultrastrukturu zoospor. Takto vytvořený systém však nepočítá s morfologickou variabilitou jednotlivých kmenů hub způsobenou biotopem, v němž se hostitelské zvíře vyskytuje.

Nedávný rozvoj molekulárně genetických metod však nabízí řadu způsobů ke zkoumání taxonomie a fylogenetické příbuznosti izolovaných kmenů na základě analýzy DNA, která není morphologickými změnami ovlivněna ^[126].

Všechny dosud popsané druhy anaerobních hub tvoří během svého vývoje zoospory, a proto byly zařazeny v roce 1980 podle Barra^[8] do kmene *Eumycotina*, podkmene *Mastigomycotina* a třídy *Chytridiomycetes*. Taxonomie hub prošla několika změnami a v roce 2007 byla klasifikace hub přehodnocena Hibbetem a kol. a bachorové houby byly zařazeny do nového kmene *Neocallimastigomycota*, třídy *Neocallimastigomycetes*, řádu *Neocallimastigales* a čeledi *Neocallimastigaceae* ^[83].

Dnes je popsáno 16 druhů patřících do 6 rodů ^[191], které jsou shrnuty v tabulce 1.

Nynější klasifikace anaerobních hub ^[83]:

Kmen: *Neocallimastigomycota*

Třída: *Neocallimastigomycetes*

Řád: *Neocallimastigales*

Čeleď: *Neocallimastigaceae*

Tab. 1. Rozdělení rodů anaerobních hub a jejich stručná charakteristika ^[193, 142]

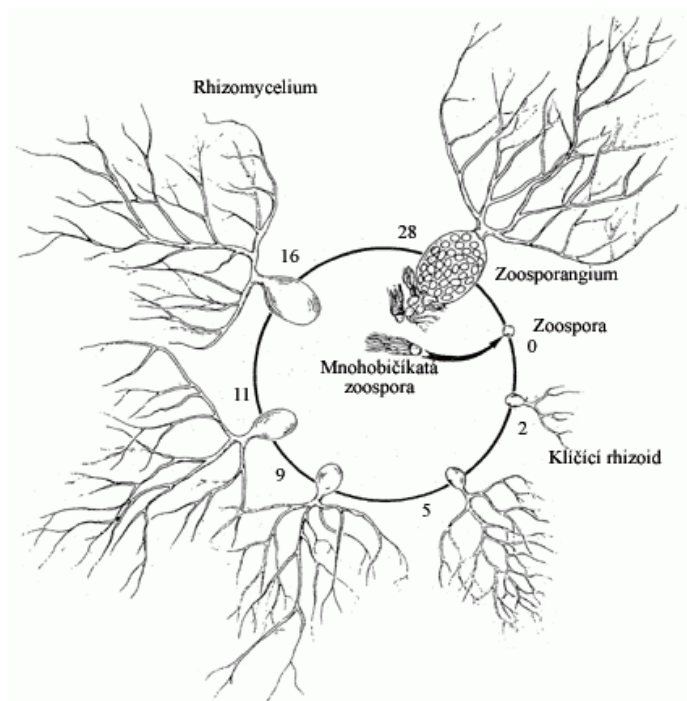
Rod a charakteristika	Druh	Hostitelské zvíře	Reference
Caecomycetes monocentrická nebo polycentrická stélka, jednobíčíkaté zoospory	Caecomycetes communis	ovce	[67]
	Caecomycetes equi	kůň	[67]
	Caecomycetes sympodialis	kráva	[39]
Piromycetes monocentrická stélka, jednobíčíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Piromycetes communis	ovce	[67]
	Piromycetes mae	kůň	[109]
	Piromycetes dumbonica	slon	[109]
	Piromycetes rhizinflata	slon	[109]
	Piromycetes minutus	jelen	[84]
	Piromycetes spiralis	koza	[85]

Rod a charakteristika	Druh	Hostitelské zvíře	Reference
Neocallimastix monocentrická stélka, polybičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Neocallimastix frontalis	ovce	[79]
	Neocallimastix	ovce	[140]
	patriciarum	ovce	[205]
	Neocallimastix	kráva	[86]
	hurleyensis		
	Neocallimastix variabilis		
Cyllamyces polycentrická stélka, jednobičíkaté zoospory	Cyllamyces aberensis	ovce	[142]
Anaeromyces polycentrická stélka, jednobičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Anaeromyces mucronatus	ovce	[30]
	Anaeromyces elegans	kráva	[87]
Orpinomyces polycentrická stélka, polybičíkaté zoospory, vláknité rhizomycelium	Orpinomyces joyonii	ovce	[29]

1.2.2 Životní cyklus anaerobních bachorových hub

Životní cykly anaerobních hub jsou si velmi podobné a je pro ně typické střídání motilní fáze zoospor s nemotilní vegetativní fází stélky ^[141]. Stélka nese sporangium, ze kterého se uvolňují zralé zoospory (viz obr. 1). Zoospory se aktivně pohybují pomocí bičíkatého aparátu. Díky chemoreceptorům lokalizují rostlinné pletivo a zachytí se na pevném xylemu. Dále nastává encystace, penetrace rostlinných vláken rhizoidy a vytvoření nového sporangia. K uvolnění spor dochází 0,5-1 hodinu po nakrmení zvířete ^[132, 133, 134, 135]. Zoosporogenese je indukována sacharidy rozpustnými ve vodě, které jsou přítomny v krmivu, a také hemem, jehož deriváty jsou prostetickými skupinami některých rostlinných enzymů ^[132, 203, 139, 136]. Dosud byly identifikovány ^[138] čtyři chemoreceptory pro glukosu, fruktosu, mannitol a mannosu nebo pro jejich směs se sacharosou. Chemotaxe zoospor se projevila už při 1 µM koncentraci sacharosy. U zoospor byl také pozorován améboidní pohyb po povrchu rostlinné hmoty. Je-li hostitelské zvíře krmeno jednou denně, trvá životní cyklus druhů rodu *Neocallimastix* asi 24-35 hodin ^[94, 113]. Pokud má zvíře kontinuální přísun potravy, může se

životní cyklus urychlit až na 8 hodin ^[136]. Invaze hub je tedy poměrně rychlá. Zoospory obsazují části rostlin opracované přežvykováním, kde dozrávají do vegetativního stadia. Rhizoidy poté pronikají hluboko do pletiv, kde tráví polymery buněčných stěn ^[102].



Obr. 1. Životní cyklus anaerobních bachorových hub ^[191]

1.2.3 *Metabolismus hexosy*

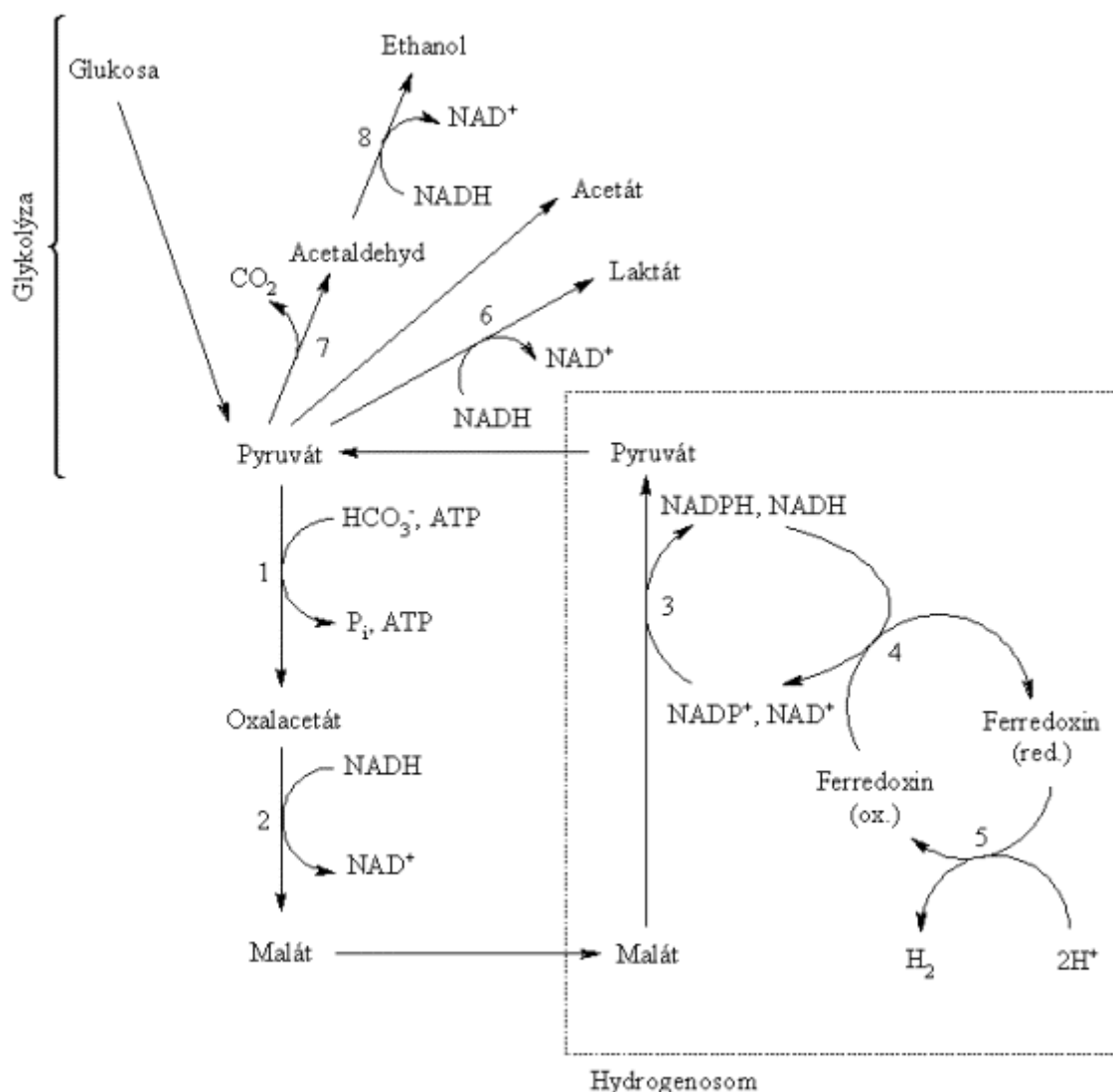
Bachorové houby se přizpůsobily anaerobnímu prostředí ztrátou mitochondrií ^[217, 131]. Nejsou schopny tvořit energii aerobním nebo anaerobním dýcháním a nemohou tedy hromadit redukující ekvivalenty v transportním řetězci elektronů s kyslíkovým akceptorem ^[171]. Zvláštním energetickým centrem anaerobních hub jsou hydrogenosomy, orgány produkující energii ve formě ATP za současné produkce H_2 ^[129, 217]. Houby získávají energii anaerobním kvašením uhlovodíků. V tomto procesu vystupují uhlovodíky jako akceptory i donory elektronů. Anaerobní kvašení vykazuje menší energetický zisk oproti aerobnímu dýchání, protože část energie zůstává vázána v produktech ^[171]. Při aerobním dýchání se kompletní oxidací 1 molu glukosy za vzniku H_2O a CO_2 získá 36 molů ATP, zatímco při anaerobní fermentaci jen 2 moly ATP. V zoosporách anaerobních hub jsou hydrogenosomy umístěny v blízkosti bičíku ^[128, 127, 204]. Toto umístění obdobné poloze mitochondrií v aerobních

zoosporách vede k předpokladu, že velká část energie vyrobené v hydrogenosomech je použita na pohyb bičíku ^[191].

Metabolismus glukosy byl zkoumán na dvou houbách, a to na druhu *N. patriciarum* a *N. frontalis* ^[217, 131]. U obou organismů se projevuje spojení několika anaerobních metabolických cest. U *N. frontalis* je pyruvát, který vzniká glykolysou z glukosy, přeměněn pomocí enzymu pyruvátcarboxylasy na oxalacetát, který je redukován maláthydrogenasou na malát. Malát je transportován do hydrogenosomů, kde hydrogenosomální enzymy vytvářejí energii oxidací pomocí NADH:ferredoxin oxidoreduktasy. Protonová redukce probíhá přes ferredoxin a hydrogenasu na H₂ (viz obr. 2). Pyruvát vytvořený oxidací je přenesen zpět do cytoplazmy, kde je přeměněn na oxalacetát nebo redukován laktátdehydrogenasou na laktát. Ten je metabolizován na acetát nebo dekarboxylován pyruvátdekarboxylasou na acetaldehyd s následnou přeměnou na ethanol ^[217, 131].

U houby *N. patriciarum* je i přes podobnost základních cest rozdíl v metabolismu hexos. Glukosa je prvotně přeměněna na fosfoenolpyruvát. Fosfoenolpyruvát je následně karboxylován na oxalacetát, před redukcí na malát. Pyruvát produkovaný v hydrogenosomech je přeměněn na fosfoenolpyruvát pyruvátkinasou a dochází k přeměně na konečné produkty kvašení.

U mnohých anaerobních hub ale vznikají i jiné produkty ^[190]. Přítomnost pyruvát-formát lyasy naznačuje, že pyruvát je štěpen na mravenčan a acetyl CoA, který je dále metabolizován na ethanol a acetát ^[73]. Závěrem tedy lze shrnout, že anaerobní houby přeměňují hexosu na mravenčan, acetát, laktát, ethanol, CO₂ a H₂ ^[11, 114, 145, 22]. Mnohem méně je známo o konečných produktech kvašení na jiných substrátech než je glukosa ^[191].



Obr. 2. Metabolismus glukosy u *Neocallimastix frontalis* ^[131]

Enzymy účastníci se metabolismu: 1- pyruvát karboxylasa, 2- malát dehydrogenasa, 3- „jablečný enzym“, 4- NADH(NADPH): ferredoxin oxidoreduktasa, 5- hydrogenasa, 6- laktát dehydrogenasa, 7- pyruvát dekarboxylasa, 8- alkohol dehydrogenasa

1.2.4 Enzymy degradující rostlinnou biomasu

Bachorové houby mají mimořádnou schopnost účinně degradovat rostlinná pletiva tvořená celulosou, xylanem a ligninem, glykogenem, škrobem či inulinem ^[145, 113]. Anaerobní houby jsou schopny úspěšně rozkládat i velmi odolný vaskulární systém či sklerenchymální pletivo, obecně považované za nedegradovatelné. Houby v bachoru jsou prvotními kolonizátory rostlinné biomasy, otvírají a zpřístupňují tak rostlinné stěny buněk dalším bachorovým mikroorganismům ^[126]. Anaerobní houby mají totiž k dispozici velkou škálu hydrolytických

enzymů, které umožňují dokonale rozkládat rostlinné pletivo. Spektrum enzymů zahrnuje celulasy ^[115, 7, 187], hemicelulasy ^[115, 125], xylanasy ^[187], glukosidasy a xylosidasy ^[80], disacharidasy ^[80], pektinlyasy ^[72], esterasy kyseliny ferulové a kumarové ^[24, 25, 26], amylasy, amyloglykosidasy ^[124, 144] a v neposlední řadě proteasy ^[202, 5, 119]. Většina informací o těchto enzymech byla získána z nepřečištěných extraktů z kultur. Jak stélka, tak i zoospory vykazovaly produkci hydrolytických enzymů ^[209, 210]. Některé hlavně extracelulární enzymy jako β -xylosidasa ^[81], xylanasa ^[187], β -glukosidasa ^[81, 36] a esterasa kyseliny kumarové a ferulové byly purifikovány a charakterizovány.

Přehled některých hydrolytických enzymů:

α -xylosidasa (EC 3.2.1.-)

Katalyzuje hydrolýzu α -xylosy z neredukující terminální glukosy xyloglukanu či jiných xylooligosacharidů.

β -galaktosidasa (EC 3.2.1.23, exo-(1 \rightarrow 4)-beta-D-galaktanasa)

Hydrolyzuje β -galaktosidasu na monosacharidové jednotky, odštěpuje galaktosylové zbytky z neredukujících konců oligosacharidů. Galaktohydrolasa, nazývaná také laktasa, katalyzuje hydrolýzu β -D-galaktosidu v přítomnosti vody na galaktosu a ethanol. Tento enzym se nachází v mnoha mikroorganismech, rostlinách a zvířatech. β -galaktosidasu je možné využít pro určení laktosy v biologických tekutinách, při výrobě potravin a při metodě ELISA jako konjugát s protilátkami.

β -glukosidasa EC 3.2.1.21

Odštěpuje od neredukujícího konce sacharidu β -D-glukosové jednotky.

α -glukosidasa (EC 3.2.1.20, α -D-glukosid-glukohydrolasa)

Hydrolyzuje 1,4- α -glykosidické vazby oligosacharidů, tzn., odštěpuje α -D-glukosové jednotky z neredukujícího konce oligosacharidů. α -glukosidasy různého původu se výrazně liší svými vlastnostmi a jsou klasifikovány jednak podle substrátové specifity, jednak podle primární struktury. Praktické využití α -glukosidas se nabízí v medicíně, a to v oblasti diagnostické i v terapiích.

Xylanasa, β -xylosidasa

Viz kapitola Xylanolytické enzymy

N-acetylglukosaminidasa, endochitinasa, exochitinasa

Viz kapitola Chitinolytické enzymy

Amylasy (EC 3.2.1.1, EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.3)

Škrob je zásobní rostlinný polysacharid skládající se z α -amylosy a amylopektinu. α -amylosa je lineární polymer složený z α -1,4-glukopyranosových jednotek a zaujímá cca 20 % škrobu. Amylopektin je navíc větven α -1,6-glykosidickými vazbami a zaujímá cca 75 % škrobu. Amylasy katalyzuje hydrolyzu 1,4- α -D-glykosidových vazeb v polysacharidech (amylosa, amylopektin, glykogen) obsahujících tři a více takto vázaných D-glukosových jednotek za vzniku dextrinu, maltotriosy a maltosy. Podle místa působení a vznikajících produktů rozlišujeme tři základní druhy amylas: α -amylasy, β -amylasy a γ -amylasy. α -Amylasy jsou extracelulární enzymy, které atakují 1,4- α -D-glykosidové vazby na kterémkoliv místě polymerů obsahujících tři a více těchto vazeb. Dokážou obejít větvení s vazbou 1,6- α -D. Jedná se o endoglykosidasu, systematicky o 1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasu (EC 3.2.1.1). Produktem hydrolytického štěpení amylosy je směs glukosy a maltosy. Amylopektin a glykogen jsou štěpeny náhodně na 1,4- α -D-glykosidových vazbách, přičemž 1,6- α -D vazby zůstávají nedotčeny. Vznikají tak větvené i nevětvené oligosacharidy (α -dextriny). Rozlišují se dva druhy α -amylas: zkapalňující a zcukrující. Zkapalňující α -amylasa degraduje oligomery, které obsahují více jak 15 glukosových jednotek, zatímco zcukrující α -amylasa štěpí tetramery glukosy. β -Amylasy pravidelně štěpí 1,4- α -D-glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Z amylosy vzniká prakticky kvantitativně maltosa, uvolňovaná jako β -anomer. β -Amylasy patří mezi exoglykosidasu, systematicky je tento enzym označován jako 1,4- α -D-glukan-maltohydrolasa (EC 3.2.1.2). Amylopektin a glykogen štěpí také z neredukujícího konce až k větvení 1,6- α -D, které enzym štěpit nemůže. Dextrin, vzniklý takovou hydrolyzou amylopektinu, se nazývá limitní dextrin a je to rovněž β -anomer. Amylasy postupně rozkládají dextriny dále, přičemž větvení 1,6- α -D-glykosidové vazby pomáhá hydrolyzovat amylo-1,6-glykosidasu. γ -Amylasy hydrolyzuje samostatné glukosové jednotky z neredukujícího konce amylosy nebo amylopektinu. Systematicky se označuje jako 1,4- α -D-glukanglukohydrolasa (EC 3.2.1.3). Je termostabilní a štěpí polysacharidy na rozdíl od α -amylasy nejen na vazbách 1,4- α -D-, ale i na

vazbách 1,6- α -D (i když s mnohem menší rychlostí). Výsledkem její aktivity je β -D-glukosa, maltosa a limitní dextriny.

Pektinhydrolasy (EC 3.2.1.82, EC 3.2.1.15)

Pektin je heteropolysacharid obsažený v buněčných stěnách rostlin složený z jednotek kyseliny galakturonové, které jsou spojeny α -1,4-galaktosiduronovou vazbou. Kyselina galakturonová obsahuje velké množství metyl-esterů a do její struktury jsou zapojeny oligosacharidové jednotky z L-rhamnosy, D-galaktosy a L-arabiny ^[177]. Na degradaci pektinu spolupracuje velké množství enzymů dělených do dvou základních skupin. První skupina zahrnuje methylestery odštěpující metoxy-skupiny a druhá skupina zahrnuje depolymerasy štěpící vazby mezi jednotkami (hydrolasy a lyasy). Pektinhydrolasy můžeme rozdělit do dvou skupin dle způsobu štěpení. Exopolygalakturonosidasa (EC 3.2.1.82) odštěpuje od neredukujícího konce pektinu mono a digalakturonidy, na rozdíl od endopolygalakturonasy (EC 3.2.1.15), která štěpí uvnitř molekuly α -1,4-galaktosiduronové vazby ^[78, 120].

Pektátlyasa (EC 4.2.2.2)

Enzym zvaný také polygalakturonát lyasa se podílí na štěpení vnitřních α -1,4-galaktosiduronových vazeb polygalakturonátu za tvorby nenasyčených oligogalakturonidů složených ze 4 nebo 5 jednotek kyseliny galakturonové ^[1].

Celulasa (EC 3.2.1.4; 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glukan 4-glucanohydrolasa)

Obecně katalyzuje rozklad celulosy a je produkována velkou škálou mikroorganismů jako prvoci, houby a bakterie. Hydrolyzuje 1,4- β -D-glukosidové vazby v celulóse, β -glukanu či licheninu.

Laminarinasa (EC 3.2.1.39; 1,3- β -D-glukan glucanohydrolasa)

Hydrolyzuje 1,3- β -D-glukosidové spojení v 1,3- β -glukanu.

Lipasa (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolasa)

Katalyzuje hydrolyzu triacylglycerolů na monoacylglyceroly a mastné kyseliny

Proteasy (EC 3.4.21.-)

Tyto enzymy štěpí proteiny, hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin, pomocí kterých drží v peptidickém řetězci. Je známo celkem 6 různých typů proteas. Proteasy se dělí dle místa štěpení bílkoviny na exoproteasy a endoproteasy. Exoproteasy odštěpují aminokyseliny od terminálních konců proteinů, zatímco endoproteasy štěpí proteiny uvnitř peptidického řetězce a narušují terciální strukturu. Daleko významnější úlohu hrají endoproteasy, které se rozlišují na cysteinové, serinové a treoninové, dále na metaloproteasy, glutamátové proteasy a aspartátové proteasy.

Endoglukanasa (EC 3.2.1.6; 1,3-(1,3;1,4)- β -D-glukan 3(4)-glucanohydrolasa)

Hydrolyzuje 1,3 nebo 1,4 vazby v β -glukanu, kde jsou glukosové zbytky zahrnuté do vazby substituovány na C3.

Mannosidasa (EC 3.2.1.24, α -D-mannoside mannohydrolasa)

Hydrolyzuje terminální neredukující α -D-mannosový zbytek v α -D-mannosidech.

Cellobiohydrolasa (EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glukan cellobiohydrolasa)

Hydrolyzuje 1,4- β -D-glukosidové vazby v celuloze a cellotetraose.

1.3 Chytilolytické enzymy

1.3.1 Úvod

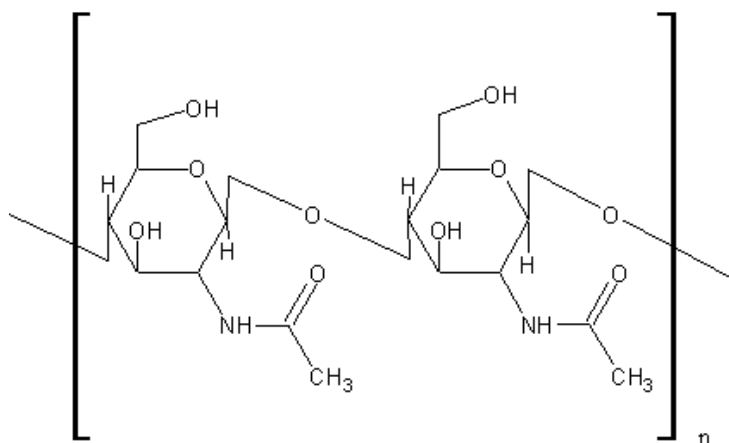
Obecný pojem chitinasy v sobě zahrnuje enzymy, které se podílejí na degradaci chitinu. Patří mezi ně endochitinasa a exochitinasa {[poly (1,4- β -(2-acetamido-2-deoxy-D-glukosid)] glykanohydrolasy}, které jsou, i přes rozdílný mechanismus štěpení, zařazeny v nomenklatuře pod stejné číslo EC 3.2.1.14. Dále se při štěpení chitinu uplatňuje N-acetylglukosaminida (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukosidacetamidodeoxygluko-hydrolasa) a N-acetylhexosaminidasa (obě jsou vedeny pod stejným nomenklaturním číslem EC 3.2.1.52) ^[154].

Chitinasy jsou produkovány celou řadou organismů, přičemž fyziologická role chitinas se značně liší. Patogenní funkci mají chitinasy produkové houbami, protozoi či bakteriemi, které napadají členovce a hmyz. Naopak obranná funkce je typická pro chitinasy, které

produkují rostliny v případě zranění nebo napadení patogenními houbami. Chitinasy byly objeveny i u zvířat, a to jako obranný mechanismus v krvi přežvýkavců ^[101]. Pro mnohé bakterie, které jsou schopny využít chitin jako zdroj uhlíku a dusíku, mají chitinasy roli nutriční. Také masožravé rostliny používají chitinasy při trávení. U hub, které nevyužívají chitin jako substrát, nýbrž je pro ně strukturálním polysacharidem jejich buněčné stěny, hrají chitinasy roli morfogenetickou a autolytickou ^[71].

1.3.2 Chitin

Chitin je nerozvětvený homopolymer N-acetylglukosaminových (GlcNAc) jednotek v β -1,4 spojení, které tvoří terciální strukturu složenou z α helixů stabilizovaných intramolekulárními vodíkovými můstky do forem mikrovláken (viz obr. 3). Nejběžnější α -chitin tvoří antiparalelní uspořádání řetězců, které jsou kovalentně nebo nekovalentně spojeny s mnoha proteiny a polysacharidy. Chitin je například strukturální složka buněčných stěn hub a některých řas, jeho přítomnost v myceliu bývá užívána jako kritérium pro určování hub ^[154]. Rigidní struktura chitinu chrání formou skořápek a kutikul řadu členovců, měkkýšů, červů a jiných typů organismů. Odhadnutá roční produkce chitinu je 10^{10} až 10^{11} tun ^[101]. Syntézy chitinu se účastní membránový protein chitin syntetasa (EC 2.4.1.16), která katalyzuje přenos N-acetylglukosaminu z UDP-N-acetylglukosaminu (uridin 5'-difosfo-N-acetylglukosamin) do chitinového řetězce. Houby mají k dispozici dva druhy chitin syntetasy- chitin syntetasu 1 a 2, což bylo prokázáno při pokusu s kvasinkou *S.cerevisiae*, která produkovala chitin i po narušení genu pro Chs1 ^[34].

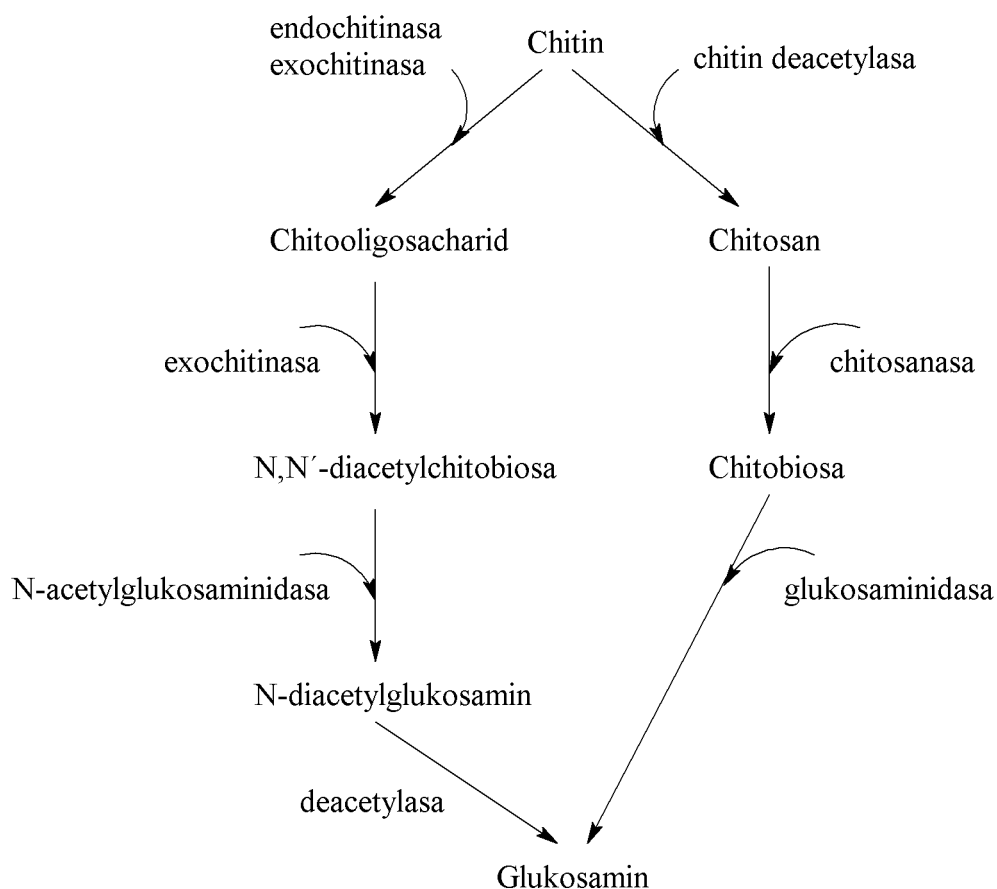


Obr. 3. Základní stavební jednotka chitinu

1.3.3 Chitinasy

Chitinasy štěpí chitin (viz obr. 4) tak, že hydrolyzují β -glykosidické vazby mezi N-acetylglukosaminovými jednotkami (GlcNAc) ^[154]. Endochitinasa štěpí náhodně uvnitř molekuly po celé délce vlákna chitinu a jejím konečným produktem jsou rozpustné nízkomolekulární multimery GlcNAc jako jsou chitotriosy nebo chitotetrosy ^[154]. Exochitinasa na rozdíl od toho postupně odštěpuje acetylchitobiosy z neredukovaného konce. Tento enzym je proto někdy nazýván jako chitobiosidasa. Finálním enzymem je β -1,4 N-acetylglukosaminidasa ^[154], která štěpí diacetylchitobiosy stejně jako chitotriosy a chitotetrosy na GlcNAc monomery. Hydrolyza terminálního neredukovaného konce N-acetylhexosaminového zbytku je provedena N-acetylhexosaminidasou ^[154].

Enzym chitin deacetylasa (chitin amidohydrolasa EC 3.5.1.41) také patří do komplexu chitinasových enzymů, neboť jeho působením dochází k odštěpení N-acetamidolových skupin z N-acetylglukosaminových jednotek, což vede ke konverzi chitinu na chitosan. Výhodou chitosanu je, že není již tak rigidní jako chitin ^[95].



Obr. 4. Schéma degradace chitinu ^[101]

1.4 Xylanolytické enzymy

1.4.1 Úvod

Xylanasy jsou glykosilované enzymy hydrolyzující xylan, které jsou většinou produkovány mikroorganismy a podílejí se na degradaci rostlinných buněčných stěn. Tyto enzymy můžeme mimo jiné nalézt u chaluh, protozoí, korýšů, šneků a v semenech rostlin^[174]. Aktivita xylanasy naměřených u mikrobiálních hub dosahovaly mnohem vyšších hodnot než u kvasinek a bakterií. Z důvodů heterogenity xylanu je pro jeho degradaci potřeba celý enzymatický komplex, jehož hlavními složkami jsou endoxylanasa a β -xylosidasa. Dalšími enzymy jsou esterasa kyseliny ferulové, esterasa kyseliny kumarové, acetylxytan esterasa, arabinasa a α -glukuronidasa.

Xylanasy jsou produkovány jak mezofilními, tak termofilními mikroorganismy^[168]. Mezi mezofilní houby produkující xylanolytické enzymy patří např. *Aspergillus* a *Trichoderma*. Mezi termofilní houby patří např. *Humicola* a *Talaromyces*. Tyto xylanasy obvykle mají formu glykoproteinů s optimální teplotou působení mezi 60 až 80°C, optimálním pH 4,5 až 6,4 a molekulovou hmotností 6 až 38 kDa. Mnoho endoxylanasy z termofilních organismů je strukturně podobných endoxylanasám z mezofilních organismů. Jejich termostabilita je přičítána speciálním disulfidovým můstkům, N-terminálnímu prolinu, solným můstkům a hydrofobicitě^[195], vyšším množstvím iontových párů a aromatických zbytků ve struktuře.

Xylanasy mají široké komerční užití a to v papírenském a textilním průmyslu, pekárenství, při výrobě krmiv pro zvířata, při výrobě vín a džusů a při produkci xylitolu a ethanolu.

1.4.2 Xylan

Xylan je nejběžnější typ hemicelulosity. Je to lineární polymer β -D-xylopyranosylových jednotek v 1,4 glykosilovém spojení. K této polysacharidové kostře jsou navázány 4-O-methyl- α -D-glukopyranosidové, acetylové a α -L-arabinofuranosilové jednotky v různém poměru. Xylan je přítomen v buněčné stěně a ve střední lamelle rostlinných buněk.

V přírodě se zřídka kdy vyskytuje hemicelulosa obsahující pouze jeden typ cukru, a proto se hemicelulosa dělí podle hlavní sacharidové jednotky na xylany obsahující v největší míře D-xylosu, mannany obsahující D-mannosu a glukany složené převážně z D-glukosy^[206, 201, 198, 57]. Obvykle je však hemicelulosa komplexem několika cukerných polymerů jako

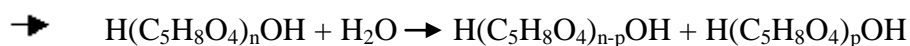
glukuronoxylan, arabinoglukuronoxylan či galaktoglukomannan ^[76, 174, 105, 173]. Množství každého komponentu je variabilní podle druhu a liší se i individuálně např. u stromů stejného druhu. Hemicelulosity ale hlavně obsahují xylan.

Arabinoxylan byl nalezen v pšenici, rýži, ječmenu či v bambusových výhoncích a jako minoritní komponent v cereálních vláknech ^[93]. Glukuronoxylany a glukuronoarabinoxylany jsou hlavně přítomny v sekundární buněčné stěně a tvoří kovalentní či nekovalentní vazby s ligninem, celulosou a jinými polymery. Glukuronoxylan je lineární polymer β -D-xylopyranosylových jednotek spojených 1,4 glykosidickou vazbou. Polysacharidová kostra obsahuje 4-O-metyl- α -D-glukuronopyranosylové jednotky a D-glukuronosylové jednotky stylizované v poloze 4 a spojené pozicí 2 nebo 3 s β -D-xylopyranosylem. Glukuronoxylan obsahuje velké množství acetylových substituentů (70-80 %) v pozici 2 anebo 3 β -D-xylopyranosylu, což ho řadí mezi částečně rozpustné ve vodě ^[44]. Glukuronoarabinoxylan hojně nalezený v měkkém dřevu má stejnou kostru, jen na každých 10 β -D-xylopyranosylových jednotek připadá jeden α -L-arabinofuranosyl. Měkké dřevo také obsahuje více-O-methyl- α -D-glukuronopyranosylových jednotek než xylan ve tvrdém dřevě. Tento xylan není tak acetylován a kvůli furanosidové struktuře jednotky arabinosy je snadno hydrolyzován kyselinami ^[147].

1.4.3 Xylanolytické enzymy (viz obr. 5) ^[147]

Endo-1,4- β -xylanasa (EC 3.2.1.8; 1,4- β -D-xylan xylanhydrolasa)

Tento enzym štěpí glykosidové spoje v kostře xylanu. Hlavním produktem tohoto enzymu jsou β -D-xylopyranosidové oligomery a při delším působení mono-, di- a tri- β -D-xylopyranosily. Zjednodušenou rovnicí se dá působení endoxylanasy popsat takto:



Wong et al. ^[214] rozdělil endoxylanasy podle molekulové hmotnosti a isoelektrického bodu do dvou skupin:

Typ A: bazické endoxylanasy, molekulová hmotnost nad 30 KDa

Typ B: kyselé endoxylanasy, molekulová hmotnost pod 30 Kda

Odlišné členění vytvořili Henrissat a Bairoch ^[82] a Törrönen a Rouvinen ^[192], kteří rozdělili endoxylanasy podle glykosidace do dvou rodin nazývaných F a G nebo 10 a 11 ^[82, 161]. Rodina 11 je více modifikována než rodina 10 ^[20]. Xylanasy rodiny 10 byly objeveny v různých bakteriích a protozoích. Xylanasy rodiny 11 jsou charakteristické nízkou molekulovou hmotností, rozdílným pI, teplotní stabilitou, pH optimem a katalytickými schopnostmi ^[192]. Tyto všechny výsledky vedly k pozdějšímu rozdělení xylanů do skupin A, B, C, D, 1, 2, 3, I, II, III ^[104, 105].

Obecně jsou endoxylanasy aktivní v rozmezí teplot 40 až 80°C a pH 4 až 6,5. Mnoho xylanů z bakterií a hub se vyskytuje v několika separovatelných formách ^[153]. To může být způsobeno rozdílnou mRNA, post-translačními modifikacemi jako glykosilace nebo proteolytickým rozkladem. Mnohonásobné xylanasy mohou být vyjádřeny různými alelami jednoho genu nebo naprosto odlišnými geny ^[175, 163, 38].

Endoxylanasy, které jsou studovány hlavně u bakterií a hub, mohou mít velmi odlišnou molekulovou hmotnost v rozmezí 8-145 kDa ^[174] a optimální funkční teplotu mezi 40 až 60°C. Houbové endoxylanasy bývají obecně méně termostabilní. Pouze mesofilní houba *Ceratocystis paradoxa* produkuje termostabilní xylanasy při 80°C po 1 hod. ^[48]. Optimální pH dosahují xylanasy v rozmezí 4-7 a stabilní jsou při pH 3-10. Xylanasy houby *Aspergillus kawachii* ^[92] a *Penicillium herque* ^[62] mají pH optimum v kyselém prostředí pH 2-6. Isoelektrický bod mají endoxylanasy z různých organismů v rozmezí 3 až 10. Bakterie produkují 2 typy xylanů: vysokomolekulární kyselou endoxylanasy a nízkomolekulární bazickou endoxylanasy. U hub jsou zaznamenány pouze nízkomolekulární bazické endoxylanasy ^[105]. Podle substrátové specifity se endoxylanasy u hub dělí na 2 hlavní typy: „neodvětující“ a „odvětující“ arabinosu jako postranní substituent ^[151]. Xylanasy např. z hub *Neurospora crassa* ^[122] či *Aspergillus niger* ^[176] patří mezi „odvětující“ endoxylanasy, naopak *Trichoderma harzianum* ^[213] nebo *Ceratocystis paradoxa* produkují „neodvětující“ endoxylanasy ^[105]. Endoxylanasy se také liší v aktivitě rozkladu celulosových substrátů. Jedny rozkládají pouze xylan, nespecifické endoxylanasy však štěpí i karboxymethyl celulosu (*Myrothecium verrucaria*, *Penicillium capsulatum*) ^[105].

Tabulka 2 shrnuje vlastnosti endoxylanů u vybraných organismů.

Tab. 2 Vlastnosti vybraných endoxylanás u některých organismů ^[147]:

Organismus	pH optimum	Teplotní optimum (°C)	Mol. hmot. (kDa)	Reference
<i>Aspergillus nidulans</i>	5,5;6,0	62,56	22,34	[58]
<i>Streptomyces</i> sp.	6,0-8,0	55-60	24,5;37,5;38	[65]
<i>Penicillium</i> sp.	2,0	50	25	[68]
<i>Bacillus</i> sp.	6,0	75	99	[10]
<i>Trichoderma harzianum</i>	5,0	50	20	[179]

1.4.3.2 β -D-Xylosidasa (EC 3.2.1.37; 1,4- β -D-xylan xylohydrolasa)

Tento enzym hydrolyzuje malé xylooligosacharidy a xylobiosy uvolněním β -D-xylopyranosylových jednotek z neredukujícího konce. Obvykle nehydrolyzuje xylan, nejvhodnějším substrátem se jeví xylobiosa. Afinita tohoto enzymu ke xylooligosacharidům je úměrná míře polymerace. Při rozkladu xylanu endoxylanásou vznikají krátké β -D-xylopyranosylové oligomery, které by mohly inhibovat endoxylanásu. Tomu zabraňuje právě xylosidasa, která hydrolyzuje tyto produkty ^[2, 218]. Vláknité houby produkují xylosidasu intracelulárně i extracelulárně. U bakterií a kvasinek je tato hydrolýza lokalizována hlavně v buňkách. Xylosidasa z hub je většinou monomerní glykoprotein, objevily se ale i dvou či trojpodjednotkové proteiny ^[174]. Obvyklá molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 60 až 360 kDa. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 4 až 5 a optimální teplota v rozmezí 40 až 80°C. Xylosidasa z *Aspergillus phoenicis* dosahovala 100% aktivity i po 4 hod. při 60°C či po 21 dnech při pokojové teplotě ^[152].

Acetylxylylan esterasa (EC 3.1.1.6)

Tento enzym odštěpuje O-acetylové skupiny z pozice 2 nebo 3 na β -D-xylopyranosylovém zbytku acetyl xylylanu. Acetylxylylan hraje důležitou roli při hydrolýze xylylanu, acetylové skupiny totiž brání přístupu endoxylylasy k páteři xylylanu a jejich odstranění zpřístupňuje xylylan endoxylylase.

Arabinasa (EC 3.2.1.55, EC 3.2.1.99)

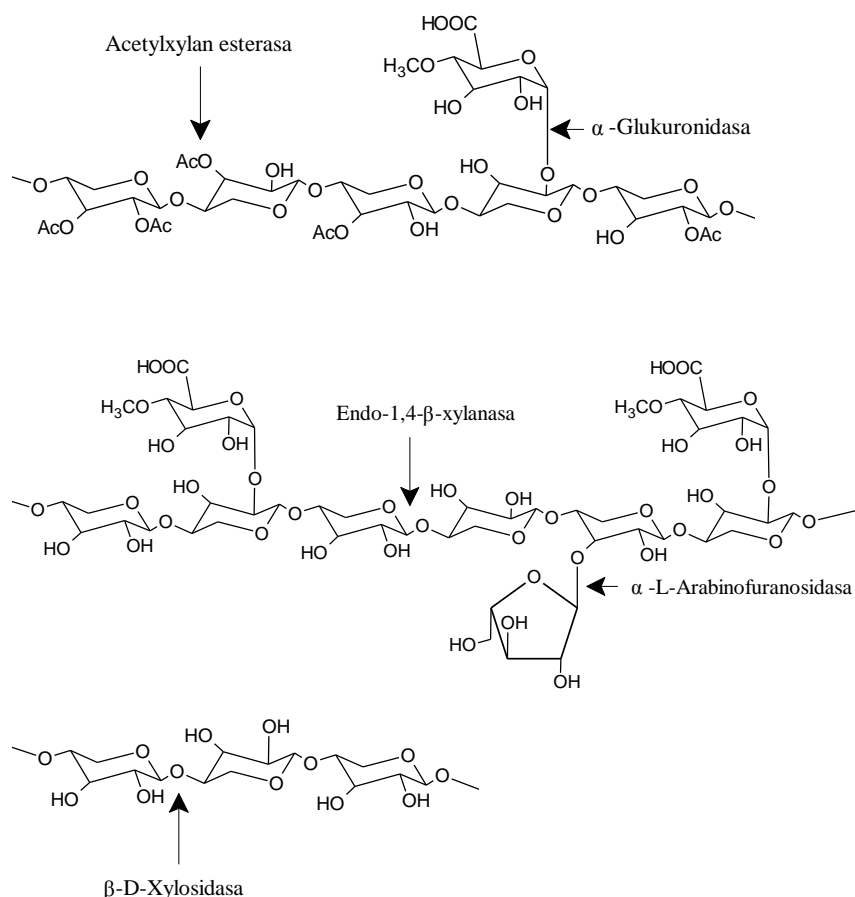
Arabinasa odštěpuje L-arabinosu z pozic 2 nebo 3 na β -D-xylopyranosylovém zbytku. Existují dva typy arabinasy s rozdílným působením. Exo- α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), která rozkládá p-nitrofenyl- α -L-arabinofuranosid a větvenou arabinosu a endo-1,5- α -L-arabinasa (EC 3.2.1.99), která hydrolyzuje pouze lineární arabinosu [97, 47]. Obvyklejší je exo typ arabinasy.

α -glukuronidasa (EC 3.2.1.-)

Tento enzym hydrolyzuje α -1,2 vazbu mezi zbytkem kyseliny glukuronové a β -D-xylopyranosylovými jednotkami v glukuronoxylanu. V některých mikroorganismech dosahuje glukuronidasa vysokých aktivit pouze za přítomnosti krátkého řetězce glukuronoxylanu, jsou ale i glukuronidasy, které hydrolyzují i neporušený celý polymer [149, 183]. Přítomnost acetylových skupin v blízkosti glukuronosylu částečně brání α -glukuronidasové aktivitě.

Esterasa kys. ferulové a esterasa kys. Koumarové (EC 3.1.1.-)

Esterasa kys. ferulové a esterasa kys. kumarové štěpí esterovou vazbu na xylylanu. Esterasa kys. ferulové štěpí esterovou vazbu mezi arabinosou a kyselinou ferulovou a esterasa kys. kumarové štěpí esterovou vazbu mezi arabinosou a kyselinou kumarovou [40, 212, 45].



Obr. 5 Schéma štěpení xylanu jednotlivými enzymy xylanolytického komplexu

1.4.4 Kooperace xylanolytického systému

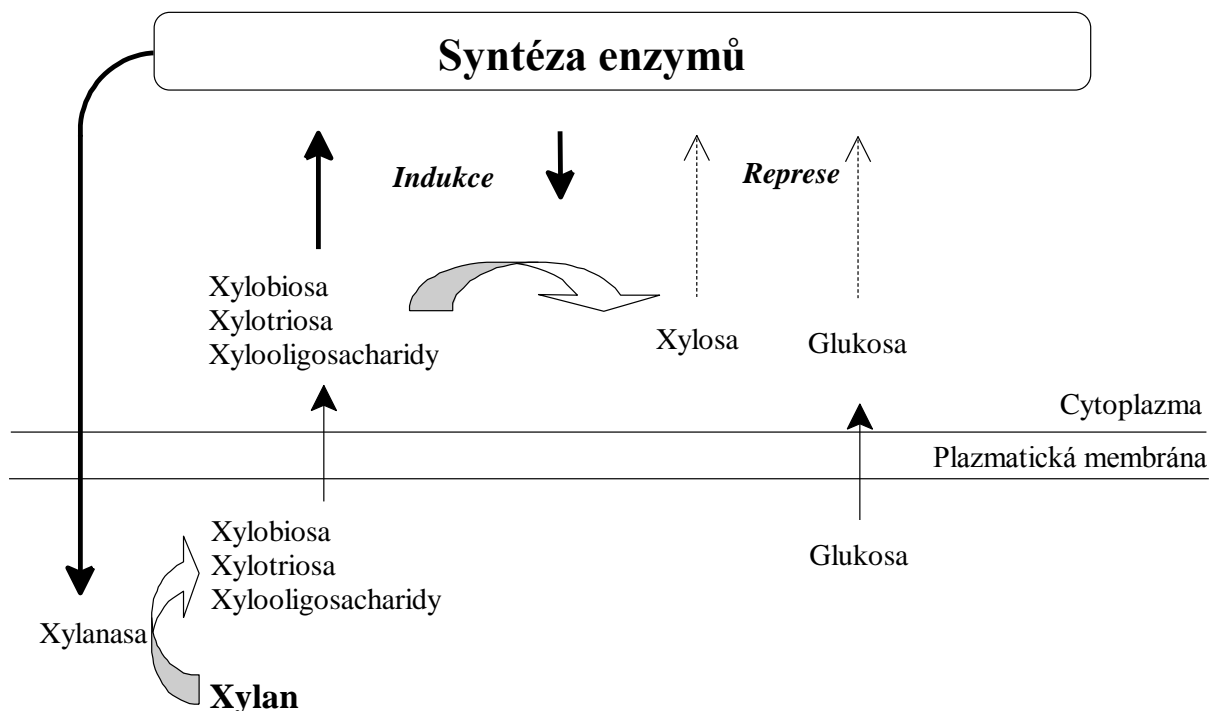
Spolupráce celého xylanolytického systému na degradaci xylanu (viz obr. 6) ^[147] umožňuje endoxylanase jednodušší degradaci jakéhokoliv xylanu ^[199, 47]. Pomocí acetylxylyl esterasy se z xylanu uvolní acetylové skupiny a xylan je přístupnější rozkladu endoxylanasou. Na druhé straně kratší acetylované polymery produkované endoxylanasou jsou substrátem pro esterasy. Substrát, jako např. pšeničné otruby, obsahující velké množství arabinoxylanu, je špatně rozkládán endoxylanasou bez předešlého působení α -arabinofuranosidasy. Z tohoto důvodu každý organismus produkuje přesné množství každého enzymu.

U některých organismů jsou xylanolytické enzymy organizovány v xylanosomu. Jde o multienzymový komplex, který je lokalizován na povrchu mateřské buňky ^[13, 50, 51, 52, 53, 54] a zprostředkovává přilnutí mikroorganismu k rostlinnému pletivu. Xylanosom, stejně jako celulosom, je strukturní protein s mnoha podjednotkami a velkou molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí 500 až 600 kDa. Tento extracelulární enzymatický komplex může

obsahovat i více než 10 proteinů s xylanolytickou aktivitou, z nichž pouze některé vykazují endoxylanolytickou aktivitu. V některých mikroorganismech je xylanosom spojen s celulosomem a vytvářejí jeden velký komplex schopný degradovat jak celulosu, tak xylan [174, 115].

Produkce xylanasy je ovlivňována vzájemným působením enzymů. Endoxylanasa je produkována jako odpověď na přítomnost xylanu v prostředí [68, 111, 150]. β -D xylopyranosylové jednotky působí jako induktory xylanolytického systému [66, 152] a kontrolují produkci endoxylanasy [60, 117]. Dalšími induktory mohou být β -metyl xylosid či různé xylobiosy [123, 166, 167]. I velké množství syntetických substrátů jako Xyl β 1-3Xyl či Glc β 1-2Xyl indukuje jejich produkci [89]. Některé syntetické homopolysacharidy jako Xyl β 1-2Xyl indukují endo-1,4- β -xylanasu, ale zároveň inhibují endo-1,4- β -glukanasu na rozdíl od heterosacharidů jako Glc β 1-2Xyl, který indukuje oba enzymy. To vede k domněnce existence různého regulačního systému pro syntézu celulas a xylanasy [147].

Xylanasy jsou produkovány za přítomnosti xylanu v prostředí, zatímco za přítomnosti celulosy jsou produkovány celulas ve spojení s xylanasami z důvodu přítomnosti některých hemicelulos v celulose. Xylanasy jsou v malé míře konstitutivně produkovány organismem a z xylanu vytváří malé oligosacharidy jako xylobiosy a xylotriosy [104, 105, 19]. Tyto jsou transportovány do buňky, kde indukují produkci dalších xylanasy. Naopak přítomnost glukosy a xylosy jejich produkci inhibuje [147].



Obr. 6 Schéma kooperace xylanolytického komplexu [147]

1.4.5 Využití xylanasy

Xylanasy mají široké biotechnologické využití [17, 4, 172, 173, 14, 15, 147, 181]. Xylan může být rozložen na oligosacharidy dvěma způsoby: enzymatickou a kyselou hydrolýzou. Kyselá hydrolýza se používá častěji, neboť je rychlejší, ale je doprovázena tvorbou řady toxických produktů, proto v poslední době narůstá zájem o využití enzymatické hydrolýzy.

Mnoho xylanasy je vyráběno komerčně (tab. 3) např. v Japonsku, Finsku či USA pomocí mikroorganismů jako *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* či *Humicola insolens*. Xylanasy spolu s celulasami a pektinásami zabírají 20 % světového trhu s enzymy. Způsoby jejich nejčastějšího využití jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3 Vybrané komerčně dostupné xylanasy

Komerční název	Distributor	Mikroorganismus	pH optimum	Teplotní optimum (°C)	Aplikace
Allzym PT	Alltech	<i>Aspergillus niger</i>	5,3	65	krmivo pro zvířata
Amano 90	Amano Pharmaceutical		4,5	50	analýza farmaceutik, potravinářství
Resinase	A/S	necitováno	necit.	necit.	papírenství
Multifect XL	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i>	5,0-5,5	55-60	potravinářství
Solvay pentonase	Solvay Enzymes	<i>T. reesei</i>	5,3-5,5	55	škrobářenský a pekářenský průmysl
Sumizyme X	Shin Nihon	<i>Trichoderma koningii</i>	5,0	55	výroba zeleninových a houbových extraktů, loupání cereálií
Xylanase	Seikagaku	<i>Trichoderma sp.</i>	necit.	necit.	studium struktury sacharidů

1.4.6 Aplikace

Krmivo pro zvířata

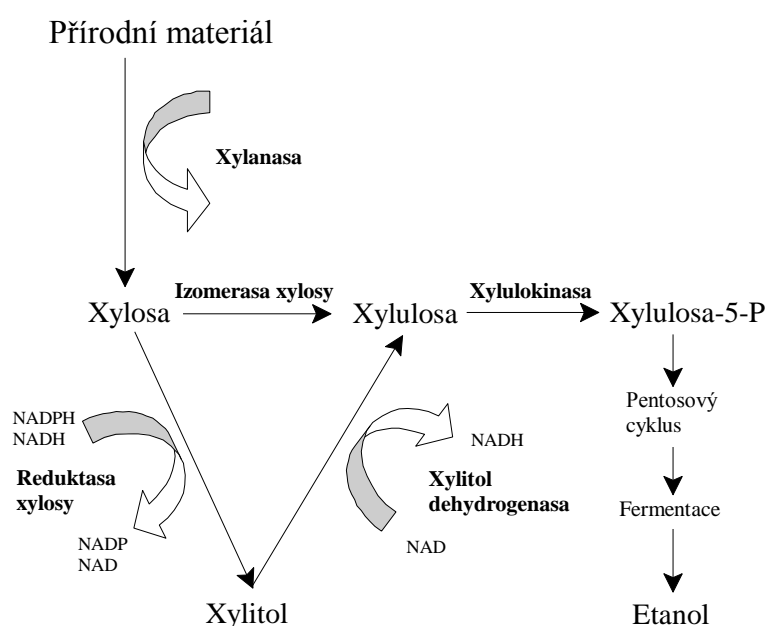
Xylanasy spolu s glukanasami, pektinasami, cellulasami, proteasami, amylasami, galaktosidasami a lipasami se používají k rozkladu arabinoxylanu v krmivech a tím ke snížení viskozity krmiva. Například rozložením arabinoxylanu v obilovinách se zvyšuje stravitelnost a využitelnost obilovin pro drůbež ^[147].

Výroba jídla a pití

Xylanasy jsou spolu s dalšími enzymy využívány v pekárenství. Rozkládají hemicelulosu v mouce, což napomáhá snadnějšímu zpracování těsta a při jejich použití chléb dosahuje větších rozměrů, lépe absorbuje vodu a zvyšuje se jeho trvanlivost ^[116, 77, 37]. Použití xylanasy zvyšuje chutnost, strukturu a zpracování oplátek. Při zpracování vín a džusů zvyšují xylanasy produkci, zvyšují zachování esenciálních látek (vitaminů či barviv) a redukují kalnost džusů. Hlavní příčinou využití xylanasy v potravinářském průmyslu je jejich vysoká stabilita a optimální pH v kyselé oblasti.

Využití ve farmaceutickém a chemickém průmyslu

Xylanasy a xylan se v malé míře používá ve farmaceutickém průmyslu jako dietní doplněk. V chemickém průmyslu se využívají pro výrobu etanolu a xylitolu (obr. 7) ^[165, 162]. Xylitol se používá jako nízkokalorické sladidlo při různých dietách a v cukrovinkách.



Obr. 7 Schéma rozkladu přírodního materiálu

Textilní průmysl

V této oblasti se xylanasy využívají při výrobě pytloviny či plátna. Díky jejich použití nemusí textilie podstupovat bělicí krok, protože nedochází k jejich oxidaci, což vede ke ztmavení vláken ^[148, 32, 46].

Papírenský průmysl

Nejdůležitější využití xylanasy při zpracování dřevoviny je při bělení celulosy. Při tomto procesu se začaly enzymy využívat v posledních dvaceti letech od doby, kdy byly peroxidasy využity při degradaci ligninu ^[200, 215, 3, 182, 6, 41, 42, 208, 160]. Při použití xylanasy pro bělení se snižuje množství chemikálií potřebných při bělení pomocí Kraftova procesu. Pro toto použití nemusí být xylanasy přečištěny, musí mít jen vyšší teplotní optimum a pH optimum v zásadité oblasti. Jejich možnost použití byla studována na několika organismech, např.: *Streptomyces roseiscleroticus* ^[143], *Streptomyces sp.* ^[14, 65], *Bacillus sp.* ^[103, 164], *Asperillus oryzae* ^[41], *Aspergillus nidulans* ^[180] a *Humicola grisea* ^[159]. Existují dvě hypotézy příspěvku xylanasy při bělení: 1. napomáhají odstranění vysráženého xylanu na ligninu ^[201], čímž ho zpřístupňují při bělení. 2. lignin má schopnost vytvářet komplexy s mnoha polysacharidy, a proto některé jeho části jsou rezistentní při Kraftově procesu ^[33]. Xylanasy tyto polysacharidy (xylan) odštěpí, čímž otevrou jeho strukturu a zase jej zpřístupní chemické extrakci.

1.5 Známé sekvence hydrolytických enzymů u bachorových hub (<http://www.cazy.org/>)

Tab. 4 Známé sekvence hydrolas u houby rodu *Anaeromyces*

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
cellulasa	CelA	GH6	449		AF529294	AAQ09258.1	
lichenasa	LicB	GH16	243		AF529296	AAQ09257.1	

Tab. 5 Známé sekvence hydrolas u houby rodu *Neocallimastix*

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
endo-1,4-glukanasa A	CelA	GH5	482	54.646	U38843	AAC63094.1	Q01409
endo-1,4-glukanasa D	Cel5D	GH5	1232	140.617	AF053363	AAC06321.1	Q59943
endo-1,4-glukanasa B	CelB	GH5	473	53.070		AAE59927.1	
			473	53.070	X77186	CAA83238.1	Q12647
			473	53.070	Z31364	CAA83238.1	
cellobiohydrolasa	CelB	GH6	412		AY328465	AAQ93324.1	
CelA	CelA	GH6	510		AY319255	AAR08200.1	
cellobiohydrolasa A	Cel6A	GH6	428		U29872	AAC49315.1	
			428	45.675		AAE59935.1	Q12646
			431		EU314933	ABY52793.1	
	CelC	GH6	429		AF529295	AAQ09256.1	
cellulasa (CelA)	CelA	GH6	510			ADO33719.1	
xylanasa B	XynB	GH10	860	88.052	S71569	AAB30669.1	Q02290
xylanasa xynsk1-20	xynsk1-20	GH11	341		AY134031	AAN08429.1	
xylanasa xynsk1-15	xynsk1-15	GH11	337		AY134032	AAN08430.1	
xylanasa xynsk1-14	xynsk1-14	GH11	342		AY134033	AAN08431.1	
xylanasa 2	Xyn2	GH11	266	29.689	X82439	CAA57820.1	Q01426
xylanasa (Xynsk1-9) (fragment)	Xyn11B	GH11	337	36.743	AY131336	AAN07082.1	Q7Z8B8

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bazi	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
xylanasa (Xynsk1-2)	Xynsk1-2	GH11	341		AY131337	AAN07081.1	
xylanasa xynsk1-12	xynsk1-12	GH11	341		AY134029	AAN08427.1	
xylanasa xynsk1-11	xynsk1-11	GH11	341		AY134028	AAN08426.1	
xylanasa xynsk1-18	xynsk1-18	GH11	341		AY134030	AAN08428.1	
ORF (fragment)		GH11	300		DQ517887	ABF66350.1	
			243		DQ517886	ABF66349.1	
xylanasa 3	Xyn3	GH11	607	66.042	X82266	CAA57717.1	Q01421
xylanasa (Xyn11A)	Xyn11A	GH11	607		AY601669	AAT99015.1	
XynC	XynC	GH11	485			AAE61565.1	
endo-1,4-β-xylanasa	XynC	GH11	485	50.192	AF123252	AAF14365.1	Q9UV68
endo-1,4-β-xylanasa	XynS20	GH11	335		EU030626	ABW04217.1	
xylanasa (fragment)		GH11	341		AY133990	AAN08348.1	
			341		AY133991	AAN08349.1	
			341		AY133989	AAN08347.1	
xylanasa A	XynA, XylA, Xyn11A	GH11	607	66.175		AAB23454.1	P29127
			607			AAS31749.1	
			607		X65526	CAA46498.1	
			607		A75565	CAB58524.1	
			551		A75567	CAB58525.1	
			510		A75569	CAB58526.1	
			241		A75571	CAB58527.1	
			269		A75573	CAB58528.1	
			165		A75575	CAB58529.1	
			338		A75577	CAB58530.1	
			282		A75579	CAB58531.1	
			236		A75581	CAB58532.1	
xylanasa (Xynw1-4)	Xynw1-4	GH11	337		AY133992	AAN08350.1	
xylanasa (Xyn1B) (fragment)		GH11	266	29.116		ACG68418.1	B5B3U7

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
xylanasa (Xyn2A) (fragment)		GH11	267	29.171		ACL80751.1	B8YQ34
endo-1,3-1,4-β-glukanasa	Lic6	GH16	245		EU314934	ABY52794.1	
acetyl xylan esterasa	BnaA, BnaI	CE6	393	42.759	U66251	AAB69090.1	O13495
acetyl xylan esterasa	Estsk1-6	CE3	319		AF531435	AAQ10006.1	
acetyl xylan esterasa	Estw1-6	CE3	319		AF531434	AAQ10005.1	
acetyl xylan esterasa	BnaIII	CE3	389	41.483	U66253	AAB69092.1	O13497
acetyl xylan esterasa	BnaII	CE2	392	42.988	U66252	AAB69091.1	O13496
endo-1,4-beta-xylanasa	XynS20E	CE1	671			ACL68347.1	
cellobiohydrolasa	CelB	CBM1	412		AY328465	AAQ93324.1	
CelA	CelA	CBM1	510		AY319225	AAR08200.1	
xylanasa B	XynB	CBM1	860	88.052	S71569	AAB30669.1	Q02290
endo-1,4-β-xylanasa	XynC	CBM1	485	50.192	AF123252	AAF14365.1	Q9UV68
cellobiohydrolasa A	CelA-Cel6A	CBM1	428	45.675	U29872	AAC49315.1	Q12646
			326			AAE59935.1	
			431		EU314933	ABY52793.1	
XynC	XynC	CBM1	485			AAE61565.1	
endo-1,4-β-xylanasa	XynS20	CBM1	335		EU030626	ABW04217.1	
CelC	CelC	CBM1	429		AF529295	AAQ09256.1	

Tab. 6 Známé sekvence hydrolas u houby rodu *Orpinomyces*

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
β-glukosidasa	Bgl1	GH1	657	75.228	AF016864	AAD45834.1	Q9UUQ3
endo-1,4-glukanasa	CelB29	GH5	477	53.664	AF015248	AAB69347.1	O13333
endo-1,4- glukanasa	CelB	GH5	388	43.835	AF015249	AAB69348.1	O13334
endo-1,4- glukanasa	CelA	GH5	910	98.311	U59432	AAC49731.1	P87211
endo-1,4- glukanasa B	CelB	GH5	471	53.103	U57818	AAD04193.1	P78719
		GH5	471			AAE59925.1	
β-mannasa	ManA	GH5	578	64.425	AF177206	AAL01213.1	Q96V96

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bazi	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
endo-1,4- glukana E	CelE	GH5	477		U97153	AAC05164.1	
CelI		GH6	490	54.051	AF177205	AAL01212.1	Q96V97
endo-1,4- glukana /cellobiohydrolasa	CelC	GH6	449	49.390	U63838	AAB92679.1	P78721
						AAE59922.1	
1,4-β-D-glukan-cellobiohydrolasa	CelD	GH6	455	50.279	U97152	AAC09066.1	Q874E1
CelH	CelH	GH6	491	53.956	AF177204	AAL01211.1	Q96V98
cellobiohydrolasa II	CelF	GH6	432	46.737	U97154	AAC09067.1	Q874E0
			432	46.736	AF031934	AAC09228.1	Q874E1
						AAE50374	
endo-1,4- glukana /cellobiohydrolasa (fragment)	CelG	GH6	193	21.150	U97155	AAC09068.1	Q874D9
endo-1,4- glukana /cellobiohydrolasa	CelA	GH6	459	50.560	U63837	AAB92678.1	P78720
						AAE59921.1	
XynB (fragment)	XynB	GH10	203		AJ863170	CAI11366.1	
xylanasa A	XynA	GH11	362	39.542	U57819	AAD04194.1	Q92257
			362			AAE12389.1	
			362			AAE59926.1	
			362			AAR39823.1	
xylanasa (XynA) (fragment)		GH11	148				ACY71584.1
lichenasa	LicA	GH16	245	27.929	U63813	AAD04192.1	O14412
acetyl xylan esterasa A	AxeA	CE6	313	38.845	AF001178	AAC14690.1	O59869
XynY (fragment)	XynY	CE1	72		AJ862908	CAI05899.1	
esterasa kys. ferulové A	FaeA	CE1	530	59.013	AF164351	AAF70241.1	Q9P8Y0
						AAR39817.1	
β-mannanasa	ManA	CBM1	578	64.425	AF177206	AAL01213.1	Q96V96
cellobiohydrolasa II	CelF	CBM1	432	46.737	U97154	AAC09067.1	Q874E0
				46.736	AF031934	AAC09228.1	Q874D8
						AAE50374	
Gpt1 (fragment)	Gpt1	GT24	78		AJ862909	CAI05900.1	

Tab. 7 Známé sekvence hydrolas u houby rodu *Piromyces*

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
β -glukosidasa	Bgl1A	GH1	664	75.801	AJ276438	CAC34952.1	Q9C122
β -glukosidasa (fragment)	Cel1D	GH1	110	11.983	AF500785	AAP30746.1	Q870B5
β -glukosidasa (fragment)	Cel1B	GH1	540	62.476	AF500783	AAP30744.1	Q870B7
β -glukosidasa	Cel1C	GH1	665	76.089	AF500784	AAP30745.1	Q870B6
β -glukosidasa	Cel3A	GH3	867	93.632	AY172977	AAO41704.1	Q875K3
			170	18.370	AF500792	AAP30752.1	Q870A9
endoglukanasa 5A	Cel5A	GH5	1714	194.849	AJ277483	CAB92326.1	Q9P867
endoglukanasa	Cel5B	GH5	549	62.631	AF165266	AAD43818.1	Q9Y870
exoglukanasa	Cel6A	GH6	486	53.849	AY124652	AAM94167.1	Q7Z7X6
CbhB	Cel6B	GH6			AF222692	AAF34679.1	
						AAN26159.1	
1,4- β -D-glukan-cellobiohydrolasa	cbhYW23-2	GH6	518		EU314938	ABY52798.1	
1,4- β -D-glukan-cellobiohydrolasa (fragment)	cbhYW23-4	GH6	345		EU314939	ABY52799.1	
sekvence 4 z patentu US 6428996	CbhA	GH6	332			AAN26160.1	
cellobiohydrolasa	cbhYW23-1	GH6	463		EU314937	ABY52797.1	
cellobiohydrolasa (Cbh6)	Cel6A	GH6	460	51.088	AF174362	AAD51055.1	Q9UW10
cellobiohydrolasa (Cbh120)	Cel6C	GH6	458	50.36	AF174361	AAD51054.1	Q9UW11
cellobiohydrolasa (fragment)	Cel6D	GH6	472	51.517	AF035401	AAD02028.1	Q93860
Cel6E (fragment)	Cel6E	GH6	97	10.328	AY091597	AAM13921.1	Q874K1
cellobiohydrolasa (fragment)	Cel6C	GH6	172	18.377	AF500790	AAP30750.1	Q870B1
exoglukanasa	Cel6A	GH6	491	53.802	AY082395	AAL92497.1	Q874K3
cellobiohydrolasa (fragment)	Cel6B	GH6	325	36.491	AF500788	AAP30749.1	Q870B2
1,4- β -glukanasa	Cel6G	GH6	454	49.625	AY206451	AAO47749.1	Q874B0
exoglukanasa		GH6	485			ADO33720.1	
1,4- β -glukanasa	Cel6G	GH6	454	49.625		AAO47726.1	Q874B0
endoglukanasa (fragment)	Cel9B	GH9	661	73.16	AF500793	AAP30753.1	Q870A8

Enzym	Symbol	Rodina	Počet bází	Velikost, Da	Gen Bank	Gen Pept	UniProt
cellulasa	Cel9A	GH9	778	86.034	AF459452	AAM81966.1	Q8NJX5
			771	85.186	AF459453	AAM81967.1	Q8NJX6
xylanasa (fragment)		GH11	224	24.976	AF297649	AAG18439.1	Q9HFT3
endo-1,4-β-xylanasa (xynWF1)	xynWF1	GH11	362		EU314935	ABY52795.1	
xylanasa A	XynA	GH11	625	68.049	X91858	CAA62969.1	Q12667
xylanasa (fragment)		GH11	277		AY130763	AAN38762.1	
endo-1,3-1,4-β-glukanasa	licWF3	GH16	243		EU314939	ABY52796.1	
β-mannanasa C	ManC	GH26	569	64.115	X97520	CAA66134.1	P55298
β-mannanasa A	ManA	GH26	606	68.055	X91857	CAA62968.1	P55296
β-mannanasa B	ManB	GH26	571	64.397	X97408	CAA66061.1	P55297
mannanasa (fragment)	ManB	GH26	179	19.719	AF500786	AAP30748.1	Q870B3
β-mannanasa (fragment)	ManA	GH26	133	14.726	AF500786	AAP30747.1	Q870B4
endoglukanasa 45A	Cel45A	GH45	410	44.38	AJ277482	CAB92325.1	Q9P868
cellulasa	Cel48A	GH48	760	84.648	AF449413	AAN76735.1	Q8J1E2
cellulasa	Cel48A	GH48	753	83.489	AF449412	AAN76734.1	Q8J1E3
cinnamoyl ester hydrolasa	EstA	CE1	536	55.54	AF164516	AAD45376.1	Q9Y871
			274		A84066	CAB69283.1	
			536		A84068	CAB69284.1	
esterasa kys. ferulové (fragment)	FaeA	CE1	140	16.11	AF500791	AAP30751.1	Q870B0
1,4-β-D-glukan-cellobiohydrolasa	cbhYW23-2	CBM1	518		EU314938	ABY52798.1	
protein 1	NCP1	CBM29	478	53.108	AY026754	AAK20910.1	Q9C171
β-mannanasa C	ManC	CBM35	569	64.115	X97520	CAA66134.1	P55298
β-mannanasa A	ManA	CBM35	606	68.055	X91857	CAA62968.1	P55296
β-mannanasa B	ManB	CBM35	571	64.397	X97408	CAA66061.1	P55297
mannanasa (fragment)	ManB	CBM35	179	17.719	AF500786	AAP30748.1	Q870B3

1.6 Závěr

Anaerobní houby jsou zajímavé nejen svou morfologickou jedinečností mezi houbami, ale i svou rolí v degradaci rostlinné biomasy. Pravděpodobně se vyvinuly před několika miliony let jako parazité na travách a v dnešním evolučním stádiu zauímají jedinečné místo v zažívacím traktu býložravých savců, kde se účastní kolonizace rostlinné buněčné stěny. Poprvé byla přítomnost anaerobních hub u přežvýkavců prokázána v roce 1975. Jejich objev a popis vyvrátil do té doby uznávané dogma o tom, že houby potřebují ke svému životu kyslík. Houby kolonizují zažívací trakt přežvýkavých i nepřežvýkavých býložravců po celém světě jak mezi divoce žijícími, tak i domestikovanými zvířaty a díky širokému spektru hydrolas velmi účinně degradují strukturální rostlinné polysacharidy jako celulosu a xylan.

U anaerobních hub se studuje velmi intenzivně zejména jejich celulasový systém. Hemicelulasy, zejména xylanasy, jsou také intenzivně zkoumány, avšak v menším rozsahu než celulasy. Chitinasy, které se u těchto hub podílejí na výstavbě buněčné stěny, byly u anaerobních bachorových hub dosud popsány pouze zběžně u monocentrické anaerobní houby rodu *Piromyces*. Chitinolytický i xylanolytický systém anaerobních hub je tedy nové téma.

Zájem o chitinolytické enzymy v posledních letech stoupá z několika důvodů. Jeden z důvodů je to, že chitin je na Zemi, hned po celulóse, nejrozšířenějším polysacharidem. Jeho největším producentem jsou mořské organismy a vzniká problém s likvidací tohoto odpadu, který je velice rigidní a těžce degradovatelný. Dalším důvodem zvýšeného zájmu o chitinasy je jejich potenciální využití jako antifungálních a insekticidních látek. V neposlední řadě se chitinasy studují jako významné enzymy buněčné stěny s cílem regulovat buněčný růst, ať už v supresivním či aktivačním smyslu.

Enzymy xylanolytického systému se v poslední době dostávají do popředí zájmu z důvodu jejich průmyslového využití. Doposud byly publikovány práce o endo-1,4- β -xylanase u monocentrické anaerobní houby *Neocallimastix* a *Piromyces* a polycentrické houby *Orpinomyces*. Nebyly však dosud uveřejněny žádné výsledky o enzymech xylanolytického komplexu ostatních hub.

Tato práce přináší nové a originální informace o chitinolytickém a xylanolytickém systému méně prostudovaných anaerobních hub, zejména pak houby rodu *Anaeromyces*, která patří spolu s rody *Caecomyces* a *Cyllumyces* k nejméně prostudovaným bachorovým houbám. Výsledky této studie přitom indikují velký hydrolytický potenciál této polycentrické anaerobní houby.

2. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této práce je prohloubení našich znalostí o hydrolasach anaerobních bachorových hub obývajících trávicí trakt přežvýkavců se zaměřením na 2 důležité komplexy enzymů:

- 1, komplex chitinolytických enzymů – chitin je jednou ze základních složek buněčných stěn hub, a proto chitinasy hrají spolu s chitinsyntetasami nezastupitelnou roli v životním cyklu hub.
- 2, komplex xylanolytických enzymů – tyto enzymy napomáhají rozkladu xylanu, základní složky hemicelulosity. Tím pádem hrají nezastupitelnou roli v rozkladu rostlinné potravy všech býložravců.

Předkládaná dizertační práce studuje dané hydrolytické enzymy, jejich zastoupení, dominanci, lokalizaci, kinetické, fyzikálně-chemické a genetické vlastnosti.

Právě tyto efektivní hydrolasy jsou v poslední době důvodem zvýšeného vědeckého zájmu o anaerobní houby z důvodu jejich použití v potravinářském a textilním průmyslu a při produkci etanolu a xylitolu. Nejvíce pozornosti bylo dosud věnováno rodu *Neocallimastix*, daleko méně jsou prostudovány ostatní rody.

Dalším cílem této disertační práce, který se vyvinul v průběhu experimentů, je popis nově objeveného izolátu anaerobní houby KF9.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál

Běžné chemikálie byly získány od firem Lachema Neratovice, P-LAB, s.r.o. Praha, Pliva-Lachema a.s. Brno, Sigma (USA) a TopBio (ČR).

Kvasničný autolýzát, enzymový hydrolyzát kaseinu a agar byl zakoupen z Imuny Sarišské Michalany (SR).

Standard pro elektroforézu byl zakoupen od firmy Carl Roth (Německo) a od firmy Bio-Rad (Německo). Methyl ferulát a methyl kumarát byly zakoupeny u firmy Apin Chemicals (Velká Británie), 4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranosid byl zakoupen u firmy Glycosynth (Velká Británie), směs aldotriuronové/aldobiuronové kyseliny byla zakoupena od firmy Megazyme (Irsko). Hydrazid 4-hydroxybenzoové kyseliny byl zakoupen u firmy Acros Organics (Belgie).

Během řešení této práce byla použita směs RedTaq Readymix od firmy Sigma. Ke zjištění přibližných velikostí fragmentů DNA sloužily molekulové standardy Stepladder 50 bp (Sigma), pUC18 DNA MspI digest (Sigma) a 2-log DNA ladder (New England Biolabs, USA).

3.2 Použité přístroje

spektrofotometr: Thermo spectronic Biomate

vodní lázeň: Y 28 Grant

TW 12 Julabo

MLW W 10

pH metr: pH meter 3310 Jenway

centrifuga: MLW K 23D

MLW K 23

MLW K 24

ultracentrifuga: Optima L-90K Ultracentrifuge

HAWK 15/05

autokláv: PS20A Chirana

sonikátor: Vibra cell Sonics & Materials Inc.

analytické váhy: L420 D Sartorius laboratory
termostat: TCH 100 Laboratorní přístroje Praha
mikropipety: Nichipet EX Nichiryo
špičky: Neptune
ultrafiltrační cely model 8400, model 8010 Amicon, Millipore
aparatura pro elektroforesu: BIO-RAD
chlazení elektroforesy: Haake K20, DC 10
HPLC: Spectra System AS3500, P2000, Spectra Focus RI-71
plynový chromatograf: Agilent GC 6890N
mikroskop: LEICA DM 2500 s kamerou LEICA DFC 480
sekvenační přístroj: 3100 Avant Genetic Analyser
termocyklér: T-personel Combi
lyofilizátor: LYOVAC GT2
míchačka: Grant Boekel VSR23
míchadlo: VELP Scientifica ARE
třepačka: Yellow line OS 2 Basic

3.3 Izolace a kultivace anaerobních hub

3.3.1 Transport tráveniny pro izolaci bachorových hub

Vzorky bachorové tekutiny pro izolace hub byly přepravovány z terénu do laboratoře v termoboxu buď přímo v anaerobním médiu nebo v Petriho miskách při teplotě okolo 30°-35°C. Během dvou hodin byly vzorky resuspendovány v anaerobním dlučném roztoku (viz 3.3.4). Takto zředěná suspenze, i s částí nestrávené potravy, byla inokulována do růstového media M10^[35] s glukosou a antibiotiky a poté byly kultury umístěny do termostatu a při 39°C kultivovány po dobu 2-5 dní.

3.3.2 Izolace a uchovávání čistých kultur hub

Anaerobní bachorové houby byly z trusu či bachorové tekutiny přežvýkavců izolovány metodou Joblina^[94]. K získání čistých kultur bachorových hub bylo třeba odstranit bakteriální kontaminaci. K tomuto účelu se používá směs antibiotik penicilinu, streptomycinu

a chloramfenikolu, tak jak je uvedeno v kapitole 3.3.4 (pro monocentrické houby směs penicilinu a streptomycinu, pro polycentrické houby směs všech 3 antibiotik). Opakovanými subkultivacemi na médiu s antibiotiky se houby zbavují bakterií a poté se kultivují na agarových plotnách (1,5 % agar s médiem M10 ^[121, 189]) a myceliální kolonie se vypichují opět do kapalného média. Kultivace hub v Petriho miskách probíhala ve speciálních anaerobních nádobách, které umožňovaly udržet kolem agarových ploten anaerobní prostředí po dobu tří až pěti dnů. Poté byly pod mikroskopem vytipovány kolonie hub vhodné k izolaci, které byly inokulovány do 20-ti ml lahvíček obsahujících stejné medium bez agaru. Identifikace byla provedena nejen na základě morfologických vlastností, ale i molekulárně-genetickou analýzou 18S rDNA ^[59] (viz 3.3.3). Izoláty byly dále uchovávány pravidelným pasážováním v tekutém mediu stejného složení s glukosou nebo cellobiosou, avšak bez agaru. Vždy po čtyřech dnech byly izolované kultury přeočkovány.

Pro dlouhodobé uskladnění životaschopných hub byly houby zmrazeny při -80°C v 5 % roztoku ethylenglykolu. Uchování při -80°C je časově omezeno pouze na několik měsíců, anaerobní houby nejsou příliš tolerantní ke kryogenním technikám, úspěšnost přežití po zamražení je asi 50%. Zmrazení nemá vliv na morfologický vzhled ani metabolickou aktivitu kultur ^[130].

3.3.3 Molekulárně-genetická analýza 18S rDNA

Pro izolaci DNA z anaerobních hub byla použita 4 dny stará kultura narostlá na médiu M10 ^[35] se 7 g/l glukosy. DNA byla izolována pomocí komerčního kitu PowerSoil DNA Kit a z genomické DNA byly poté amplifikovány fragmenty ohraničené primery ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') a ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') a fragmenty s primery NL1 (5'-GCATATCAA TAAGCGGAGGAAAAG-3') a NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') ^[207] pomocí polymerázové řetězové reakce za využití Readymix™ Redtaq™ PCR reaction mix. Směs obsahovala 1 µl DNA, 1 µl primeru ITS1 či NL1, 1 µl primeru ITS4 či NL4, 7 µl dH₂O a 10 µl PCR Readymix. Amplifikace probíhala za těchto teplotních podmínek: 94°C/4 min. - denaturace, poté 35 cyklů 94°C/30s - denaturace, 42°C/30s – nasedání primerů a 72°C/45s – syntéza PCR produktu. Konečný krok byl 72°C/4 min. Poté byly výsledné produkty přečištěny a zakoncentrovány pomocí QIAquick PCR Purification Kit. Kontrola amplifikovaných produktů byla provedena na 1% agarosovém gelu s přidavkem ethidium bromidu (10 µl/50 ml agarózového gelu) v TBE pufru.

Elektroforetické dělení DNA fragmentů probíhalo v TBE pufru při napětí 50 mV. Charakterizace ITS a NL PCR fragmentů byla provedena pomocí RFLP analýzy (restriction fragment length polymorphisms) pomocí restrikčních endonukleas *AluI*, *DraI*, *HinfI* a *MboI* (*Takara Bio Inc*, Japan). Reakce obsahovala pro produkty ITS: 5 µl DNA, 4 µl dH₂O, 1 µl příslušného pufru a 1,5 µl restrikčního enzymu a pro produkty NL: 8 µl DNA, 1 µl dH₂O, 1 µl příslušného pufru a 1,5 µl restrikčního enzymu. Reakce probíhala při 37°C po dobu 2 hod. Poté byly produkty vizualizovány elektroforetickým dělením na 2,5 % agarosovém gelu v TBE pufru při napětí 50 mV. Velikost fragmentů byla stanovena pomocí komerčního molekulového standardu.

<i>TBE pufr</i>		<i>ETB- ethidium bromid</i>	
EDTA-Na	2 mmol/l	zásobní roztok	10 mg/ml
Tris HCl pH 8	40 mmol/l		
H ₃ BO ₃	90 mmol/l		

3.3.4 Kultivační techniky a živná média

Mnoho metod a médií užívaných při studiu bachorových hub je neměnných od dob, kdy Hungate studoval anaerobní bachorové bakterie ^[90, 91]. Všechny tyto techniky a složení médií bylo upraveno pro práci s houbami. Téměř všechna média používaná pro práci s houbami nejsou zcela definována, neboť obsahují bachorovou tekutinu. Jsou upravena na pH 6,5 až 6,8 a mohou být ztuženy přidávkem agaru v koncentraci 0,8- 1,5 %. Do kultivačních médií byl přidán resazurin jako redoxní indikátor, mikro a makro minerály, organický nebo anorganický zdroj dusíku a L-cystein ^[188]. Anaerobní houby rostou na médiích s přidávkem zdroje uhlíku (glukosa, xylosa, cellobiosa) ve skleněných lahvíčkách s gumovou zátkou a hliníkovou pečetí. Jsou inkubovány při 39°C, což odpovídá teplotě v bachoru. Média jsou většinou očkovaná kousky mycelia.

Jediným zcela definovaným médiem je médium M2 ^[185] používané při kultivaci hub bez bachorové tekutiny.

Bachorová tekutina pro živná média byla připravena centrifugací 20 min. při 10000 ot/min. a sterilizována v autoklávu při 120°C po dobu 45 minut. Medium bylo připraveno anaerobně, po úpravě pH na 7,2 - 7,5 byl přidán hemin a po převaření bylo medium chlazeno a syceno plynnou fází o složení N₂ - 70 %, CO₂ - 25 % a H₂ - 5 % až do ochlazení na přibližně 30°C. Poté byl přidán NaHCO₃, po jeho rozpuštění pak cystein a růstový substrát. Následovala

úprava pH na 6,8 - 7,0. Poté bylo médium za stálého sycení plynnou fází (cca 15 minut) rozplňováno po 15 ml do 20 ml penicilínových lahvíček pro účely subkultivační a po 250 ml do 500 ml baněk pro účely experimentální. Médium bylo sterilováno v autoklávu při 120°C po dobu 45 minut.

Podrobné složení kultivačního média je uvedeno v následujících odstavcích.

Složení kultivačního média M10^[35]: na 1000 ml

čištěná bachorová tekutina	200 ml
kvasničný autolyzát	0,5 g
Bacto-Casiton	2 g
roztok heminu	10 ml
minerální roztok A	38 ml
minerální roztok B	38 ml
směs TMK	3,1 ml
resazurin (0,1 %)	0,5 ml
roztok vitamínů	2 ml
roztok mikroprvků	0,5 ml
cystein	0,5 g
NaHCO ₃	4 g
substrát	4 g
voda	708 ml

Minerální roztok A (rozpis na 100 ml)

NaCl	1,2 g
(NH ₄)SO ₄	1,2 g
KH ₂ SO ₄	0,6 g
CaCl ₂	0,12 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g

Minerální roztok B (rozpis na 100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
---------------------------------	-------

Roztok vitamínů (rozpis na 100 ml, pH 7)

B1 thiamin	100 mg
B2 riboflavin	100 mg
K1	10 ml
Biotin	100 mg
k. pantotenová	100 mg
PAB k. aminobenzoové	100 mg
nikotinamid	100 mg
B6 pyridoxin	100 mg

Roztok mikroprvků (rozpis na 100 ml, pH 7)

NiCl ₂	38 mg
H ₃ BO ₄	50 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,65 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	75 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	75 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	75 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	38 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	38 mg
KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	15 mg
Chelaton 1	15 mg
NaOH	38 mg

Směs TMK kyselin

k. octová	170 ml
k. propionová	60 ml
k. máselná	40 ml
k. isomáselná	10 ml
k. valerová	10 ml
k. isovalerová	10 ml
k. metylmáselná	10 ml
k. fenylpropionová	100 mg

Roztok antibiotik

streptomycin	1 mg/ml
chloramphenicol (poly)	1 mg/ml
penicilin	10000 U/ml
(používá se 0,1-0,5 ml na 10 ml media)	

Diluční roztok (rozpis na 1000 ml)

NaH ₂ PO ₄	15,6 g
cystein.HCl	0,6 g
NaHCO ₃	6 g
Resazurin	1 ml

Složení kultivačního média M2 ^[185] (rozpis na 1000 ml)

roztok heminu	8 ml
minerální roztok A	116 ml
minerální roztok B	116 ml
resazurin (0,1 %)	0,8 ml
roztok vitamínů	1 ml
roztok mikroprvků	8 ml
cystein	0,8 g
NaHCO ₃	4,6 g
substrát	4 g
voda	752 ml

3.4 Metody stanovení enzymatických aktivit

3.4.1 Stanovení endochitinasové, celulasové, xylanasové, amylasové, endoglukanasové, laminarinasové, pektinhydrolasové a α -glukuronidasové aktivity^[108]

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku koncentrace redukujících skupin v hydrolyzátu polysacharidu, který se projeví barevnou reakcí s POHBAHEM. Aktivita enzymu je odvozena od absorbance roztoku při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,5 % substrát (CM- chitin, CM-cellulosa, CM-xylan, škrob, glukán, laminarin, pektin, směs aldotriuronové/aldobiuronové kyseliny)

PAHBAH činidlo: 5 g hydrazidu 4-hydroxybenzoové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml 0,5 N HCl a skladováno při 4°C v tmavé láhvi (POHBAH). Vždy před pokusem byl připraven čerstvý pracovní roztok smícháním 1 objem POHBAH a 4 objemy 0,5 N NaOH.

0,3 M ZnSO₄

0,3 M Ba(OH)₂

Postup:

Do zkumavky bylo nepipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min. při 40°C. Slepé kontrolní vzorky, které obsahovaly stejnou směs, avšak nebyly inkubovány a byly ihned po smíchání zastaveny přidáním 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena 10 min. při 4000 ot/min. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena stejně jako slepé vzorky 10 min. při 4000 ot/min. V supernatantu byly stanoveny redukující cukry. Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml supernatantu, 0,2 ml dH₂O a 0,9 ml PAHBAH (pracovní roztok). Roztok byl promíchán a inkubován 10 min. při 100°C. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností

byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Jako kalibrace byla použita v závislosti na typu enzymu ředící řada roztoku N-acetyl-D-glukosaminu, glukosy, xylosy, kys. galakturonové a D-glukuronové kyseliny ve vodě v koncentracích 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg/ml.

Aktivita:

Aktivita enzymů byla vypočtena podle rovnice:

$$A = f(\text{NAG, GLU, XYL, GAL}) \times \text{průměrná extinkce} \times \text{ředění vzorku} \times \frac{\text{šířka kyvety (cm)}}{\text{doba inkubace (hod.)}}$$

$$[A] = \mu\text{g (NAG, GLU, XYL, GAL)} / \text{hod} / \text{ml}$$

$$f(\text{NAG, GLU, XYL, GAL}) = 1/a_1 \quad a_1 = \text{směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky}$$

3.4.2 Stanovení N-acetylglukosaminidasové, α-xylosidasové, β-xylosidasové, α-glukosidasové, β-glukosidasové, mannosidasové, cellobiohydrolasové, acetylxylan esterasové, arabinasové a β-galaktosidasové aktivity^[18]

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu a o-nitrofenolu proměřením absorbance při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ a přepočítání na aktivitu enzymu.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,2	%	substrát	(PNP-acetyl-β-D-glukosaminid,	PNP-α-D-xylopyranosid,
PNP-β-D-xylopyranosid,			PNP-α-D-glukopyranosid,	PNP-β-D-glukopyranosid,

PNP- α -D-mannopyranosid, PNP- β -D-cellobiosid, p-nitrophenyl acetát, PNP-arabino-furanosid, o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid)

2 % Na₂CO₃

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu PNP nebo ONP. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min. při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, ale nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,8 ml 2 % Na₂CO₃. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do proměření absorbance. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,8 ml 2 % Na₂CO₃ a směs byla promíchána. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Jako kalibrace byla použita ředící řada roztoku p-nitrofenolu nebo o-nitrofenolu ve vodě v koncentracích 0, 6, 12, 18, 24 a 30 μg PNP nebo ONP/ ml.

Aktivita:

Aktivita N-acetylglukosaminidasy, α -xylosidasy, β -xylosidasy, α -glukosidasy, β -glukosidasy, mannosidasy, cellobiohydrolasy a β -galaktosidasy byla vypočtena podle rovnice:

$$A = f(\text{NAG, XYL, PNP, ONP}) \times \text{průměrná extinkce} \times \text{ředění vzorku} \times \text{šířka kyvety} \\ (\text{cm}) / \text{doba inkubace (hod.)}$$

$$[A] = \mu\text{g (NAG, XYL, PNP, ONP)} / \text{hod} / \text{ml}$$

Při kalibraci byl použit PNP, ale při enzymatické reakci se uvolňuje NAG či XYL, proto bylo nutno přepočítat vzniklý faktor z kalibrace (f_{PNP}) na $f(\text{NAG, XYL})$ podle rovnice:

$$f(\text{NAG, XYL}) = [f(\text{PNP}) \times \text{MW (NAG, XYL)}] / \text{MW (PNP)}$$

$$f_{\text{PNP}} = 1/a_1 \quad a_1 = \text{směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky}$$

$$\text{MW (PNP)} = 139$$

$$\text{MW (NAG)} = 221$$

$$\text{MW (XYL)} = 150$$

3.4.3 Stanovení exochitinasové aktivity

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku uvolněného žlutého p-nitrofenolu. Změna absorbance byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ a přepočítána na aktivitu enzymu. Jako substráty pro enzymovou reakci je použit PNP- β -D-N,N'-diacetylchitobiosa a PNP-acetyl- β -D-glukosaminid a rozdíl v enzymových aktivitách u těchto dvou substrátů je sledovaná aktivita exochitinasy.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,2 % substrát (PNP-acetyl- β -D-glukosaminid)

0,2 % substrát (PNP- β -D-N,N'-diacetylchitobiosa)

2 % Na_2CO_3

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného vzorku, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu (glukosaminid nebo diacetylchitobiosa). Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min. při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, ale nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,8 ml 2 % Na_2CO_3 . Směs byla promíchána a ponechána v lednici do proměření absorbance. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,8 ml 2 % Na_2CO_3 a směs byla promíchána. Extinkce roztoku byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 410 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet byl použit průměr.

Kalibrace a aktivita:

Postup při sestavení kalibrační křivky i pro výpočet aktivity enzymu odpovídá postupu popsanému v kapitole 3.4.2.

3.4.4 Stanovení deacetylasové aktivity^[98]

Princip:

Metoda je založena na měření přírůstku koncentrace N-acetylglukosaminových jednotek proměřením absorbance při vlnové délce $\lambda = 650 \text{ nm}$ a přepočítána na aktivitu enzymu.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,05 % substrát (koloidní chitin)

5 % KHSO_4

5 % NaNO_2

12,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,5 % 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon

0,5 % FeCl_3

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 50 μl vhodně zředěného vzorku, 0,1 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Suspenze byla promíchána a inkubována 2 hod. při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, ale nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 250 μl 5 % KHSO_4 . Směs byla promíchána a ponechána v lednici do dalšího zpracování. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 250 μl 5 % KHSO_4 a směs byla promíchána. Poté už bylo vše prováděno v digestoři. Po přidání 250 μl 5 % NaNO_2 a za občasného promíchání byla směs ponechána 15 min. stát při pokojové teplotě. Dále bylo k roztoku přidáno 250 μl 12,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a po 5 min. bylo připipetováno 250 μl 0,5 % 3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazon-MBH. Vše bylo 3 min. povařeno v digestoři. Po zchlazení bylo ke směsi přidáno 250 μl 0,5 % FeCl_3 . Po 30 minutách stání, pokud se vytvořila sraženina, byla směs centrifugována 10 min. při 4000 ot/min. Extinkce byla měřena při vlnové délce $\lambda = 650 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Postup při sestavení kalibrační křivky je totožný s postupem při vlastním měření s tím rozdílem, že místo vzorku byla použita destilovaná voda a jako substrát různě zředěný D-glukosamin 100 mg/100 ml dH₂O, který byl naředěn 10 x dH₂O. Potom byla ředěna do zkumavek řada obsahující 0, 20, 40, 60, 80 a 100 µg D-GLU/ml.

Aktivita:

Aktivita deacetylas byla vypočtena podle rovnice:

$A = f \text{ D-GLU} \times \text{průměrná extinkce} \times \text{ředění vzorku} \times \text{šířka kyvety (cm)} / \text{doba inkubace (hod.)}$

$[A] = \mu\text{g (D-GLU)} / \text{hod} / \text{ml}$

$f \text{ D-GLU} = 1/a_1$ a_1 = směrnice přímky vypočítaná pomocí lineární regrese z kalibrační křivky

3.4.5 Stanovení aktivity proteas^[100]

Princip:

Aktivita proteas je úměrná množství uvolněných barevně značených aminokyselin z azokaseinu. Aktivita enzymu je odvozena od absorbance roztoku při vlnové délce $\lambda = 440 \text{ nm}$.

Chemikálie:

fosfátový pufr 100 mM (pH 6)

0,5 % azokasein

25 % kyselina trichloroctová

0,5 N NaOH

Postup:

Do zkumavky bylo nepipetováno 0,2 ml vhodně zředěného vzorku, 0,4 ml pufru a 0,2 ml 0,5 % azokaseinu. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min. při 40°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, ale nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,2 ml 25 % kyseliny trichloroctové. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do dalšího zpracování. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,2 ml 25 % kyseliny trichloroctové a směs byla promíchána. Extinkce byla proměřena při vlnové délce $\lambda = 440$

nm v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo Spectronic. Pro vyloučení nepřesností byly všechny reakce provedeny v tripletu pro vzorek a dabletu pro slepý vzorek a pro výpočet použit průměr.

Kalibrace:

Pro kalibraci byla proměřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 440$ nm v 1 cm kyvetách 0,01 % azokaseinu v 0,25 N NaOH.

Aktivita:

Aktivita je vyjádřena jako množství uvolněného azokaseinu do NaOH v $\mu\text{g/hod/ml}$. Zjištěná absorbance u vzorků je přepočítána na množství azokaseinu dle kalibrace a vyjádřena na dobu inkubace a množství použitého enzymu.

3.4.6 Stanovení lipasové aktivity

Princip:

Principem této metody je proměření úbytku tributyrinu po inkubaci pomocí HPLC.

Chemikálie:

1 % tributyrin

200 mM TRIS + 50 mM CaCl_2 pH 8

roztok aceton : acetonitril (63.6:36.4 v/v)

Postup:

Roztok 1% tributyrinu (sonikace 3 min. při 40 W) a 200 mM TRIS + 50 mM CaCl_2 (pH 8) byl smíchán v poměru 1:1. Do uzavíratelné zkumavy byl napipetován 1 ml pufru s tributyrinem a 0,5 ml vzorku. Suspenze byla promíchána a inkubována na třepačce 5 hod. při 37°C. Po ukončení inkubace byly vzorky 2 min. povařeny a před stanovením na HPLC uchovány v lednici.

Před samotným proměřením na HPLC byly vzorky znovu sonikovány (3 min. při 40 W) a bylo smícháno 0,7 ml tohoto rozsonikovaného vzorku a 0,8 ml roztoku aceton : acetonitril (63,6:36,4 v/v). Vlastní proměření proběhlo za použití kolony SUPELCOSIL LC-18 Column

(25 cm x 4.6 mmID) s mobilní fází aceton : acetonitril (63.6:36.4 v/v), průtok 0,5 ml/min., .
dávka vzorku byla 10 µl a detekce při 220 nm.

Kalibrace:

Kalibrace byla provedena pomocí různých koncentrací tributyrinu: 0; 0,5; 1; 2; 5 %.

3.4.7 Stanovení pektatlyasové aktivity

Princip:

Principem metody je měření částečného zvýšení absorbance při 232 nm v inkubační směsi. Zvýšení absorbance je způsobeno vytvořením dvojných vazeb v polygalaktouronové kyselině.

Chemikálie:

120 mM TRIS s 0,48 % kys. polygalakturonovou pH 8,5
2 mM CaCl₂

Postup:

Substrátový roztok byl připraven smícháním obou výše uvedených roztoků v poměru 1:1, upraven na konečné pH 8,5 a temperován na 30°C. Taktéž byl temperován vzorek na 30°C. Bylo smícháno 2,5 ml substrátového roztoku s 0,5 ml vzorku v křemenné kyvetě o obsahu 3 ml a šířce 1 cm a proměřilo se částečné zvýšení absorbance při 232 nm jako funkce času. Bylo provedeno 20 měření po 30 s.

Aktivita:

Aktivita pektatlyasy byla vypočtena podle rovnice:

$$A = \frac{\Delta A_{232} \times V_{RS}}{4600 \times V_{EE} \times c_{BIL} \times t}$$

[A] = mol/mg/min

ΔA_{232} = změna absorbance v lineární části zvýšení

V_{RS} = objem reakční směsi (ml)

$4600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = koeficient mol. extinkce

V_{EE} = objem vzorku (ml)

c_{BIL} = koncentrace bílkovin ve vzorku (mg/ml)

t = čas změny (min.)

3.4.8 Stanovení aktivity esterasy kyseliny ferulové a kumarové

Princip:

Metoda je založena na vzniku kyseliny ferulové a kumarové ze substrátu methyl ferulátu a methyl kumarátu. Tyto jednotlivé složky jsou děleny na HPLC a odlišují se retenčním časem.

Chemikálie:

100 mM MOPS pufr (pH 6) s 5 mM methyl ferulátem nebo kumarátem

10 % kyselina octová

roztok methanol:H₂O v poměru 7:3

Postup:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,3 ml MOPS pufru s 5 mM methyl ferulátem nebo kumarátem a 0,3 ml vzorku. Suspenze byla promíchána a inkubována 60 min. při 50°C. Slepý vzorek, který obsahoval stejnou směs, ale nebyl inkubován, byl ihned po smíchání zastaven přidáním 0,6 ml 10 % kyseliny octové. Směs byla promíchána a ponechána v lednici do dalšího zpracování. Po ukončení inkubace bylo do zkumavek napipetováno 0,6 ml 10 % kyseliny octové a směs byla promíchána.

Vznik produktu byl proměřen pomocí HPLC za použití kolony SUPELCOSIL LC-18 Column (25 cm x 4.6 mmID). Vzorek nebyl nijak upravován. Jako mobilní fáze byl použit roztok methanol:H₂O v poměru 7:3, průtok 0,5 ml/min. Dávka vzorku byla 10 µl. Detekce píků byla provedena při vlnové délce 325 nm.

Kalibrace:

Ke kalibraci byla použita komerčně dostupná kyselina ferulová a kumarová.

3.4.9 Stanovení bílkovin metodou Bradfordové ^[28]

Princip:

Tato metoda je založena na změně absorpčního maxima Coomassie Brilliant Blue G-250 z 465 nm na 595 nm. Tento indikátor existuje ve dvou barevných formách, červené a modré. V kyselém prostředí dochází k interakci mezi Coomassie Brilliant Blue G-250 s bílkovinou a díky tomu je pomocí hydrofobních a iontových interakcí stabilizována aniontová forma Coomassie Brilliant Blue G-250.

Chemikálie:

roztok A: 100 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo rozpuštěno v 50 ml ethanolu (v případě zákalu byl roztok upraven 100 mg Noritu a zfiltrován), poté bylo přidáno 100 ml 85 % H_3PO_4 a doplněno vodou do 200 ml. Výsledná barva byla červená a roztok byl uchováván v tmavé láhvi při 4°C.

pracovní roztok: 1 objem roztoku A byl naředěn 4 objemy destilované vody, výsledná barva byla hnědá.

Kalibrace:

Ke kalibraci byl použit standart BSA o koncentraci 2000 $\mu\text{g/ml}$. Kalibrační řada obsahovala ředění 0, 250, 500, 1000, 1500 a 2000 $\mu\text{g BSA/ml}$.

Postup:

0,04 ml vhodně zředěného vzorku bylo řádně promícháno s 2 ml pracovního roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250 a po 5 min. inkubace při pokojové teplotě byla proměřena intenzita vzniklého modrého zabarvení při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$ v 1 cm kyvetách na spektrometru Thermo spectronic dle daného programu.

3.4.10 Stanovení molekulové hmotnosti enzymu

Pro stanovení molekulové hmotnosti enzymu byla provedena SDS PAGE elektroforéza a zymogramy. Bílkoviny obecně byly vizualizovány SDS PAGE elektroforézou metodou dle Laemmliho ^[106] v 10 % a 7,5 % gelu se síťováním s 0,8 g a 0,6 g N,N-methylenbisakryl-

amidu. Bílkoviny byly barveny stříbrem podle Bluma ^[21]. Byla zkoušena různá doba varu vzorků (2-5 min.), použití redukujícího i neredukujícího vzorkového pufru ^[106] a stabilizace vzorku přidáním dithiotreitolu či merkaptoethanolu. Jako standardy molekulových hmotností byly použity bílkoviny o velikosti 94 kDa (Fosforylase b), 67 kDa (BSA), 43 kDa (Ovalbumin), 30 kDa (anhydraza uhličitá), 20,1 kDa (Sojový tripsinový inhibitor) a 14,4 kDa (Laktalbumin) (výrobce Pharmacia).

Ze všech bílkovin byly jednotlivé enzymaticky aktivní proteinové frakce vizualizovány pomocí zymogramů dle Flinta ^[61]. Pro endochitinasu byl do gelu zabudován CM-chitin, pro endoxylanasu byl použit CM-xylan. Při stanovování xylosidasy byl gel přelit roztokem 4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranosidu. Taktéž byla zkoušena různá délka varu vzorků a různá koncentrace zabudovaného substrátu.

3.4.10.1 SDS PAGE ELEKTROFORÉZA

Separační gel se nalije do sestavených desek po vyznačenou rysku, převrství se izobutanolem nasyceným roztokem C a nechá se zpolymerovat ve vodorovné poloze alespoň 1 hodinu. Roztok z povrchu se odsaje a gel se ekvilibruje roztokem L 30 minut. Roztok L se odsaje, prázdný prostor se zalije zaostřovacím gelem, do desek se zasunou hřebínky a gel se nechá minimálně 30 min. polymerovat. Desky se připevní k chlazenému korpusu a horní anodová nádoba se zaleje čerstvým elektrodoým pufrem M. Spodní katodový prostor je naplněn elektrodoým pufrem. Vzorky se nanesou podvrstvením do jamek po hřebínku. Vzorky se před nanesením vaří 5 minut na vroucí lázni. Tento čas se ukázal být nejvhodnější pro délku varu vzorků. Po spuštění elektroforézy se nastaví napětí 30-35 V/cm délky gelu, jakmile vzorky doputují ze zaostřovacího gelu do dělicího gelu, přestaví se napětí na 170 V/cm.

Roztoky pro SDS PAGE elektroforézu

A (100ml) : 30 g akrylamid, 0,8 g N,N-methylenbisakrylamid

B (100ml) : 10 g SDS

C (100ml) : 9,1 g TRIS rozpustit v 50 ml H₂O, konc. HCl upravit pH na 8,8

D (100ml) : 3 g TRIS rozpustit v 50 ml H₂O, konc. HCl upravit pH na 6,8

E (1000ml) : 30,3 g TRIS, 144 g glycin, 10 g SDS

F (1 ml) : 10 mg bromfenolová modř rozpustit v roztoku D

G (10ml) : 1 g persíran amonný

H (separační gel): 10 ml A, 0,3 ml B, 15 ml C, 4,4 ml H₂O, 20 μ l TEMED, 0,3 ml G

I (zaostřovací gel): 1 ml A, 5 ml D, 0,1 ml B, 3,8 ml H₂O, 5 µl TEMED, 0,15 ml G

J (vzorkový pufr - neredukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4,4 ml H₂O, 0,1 ml F

L (ekvilibrační roztok): 25 ml C, 24,5 ml H₂O, 0,5 ml B

M (elektrodový pufr): 100 ml E, 900 ml H₂O

3.4.10.2 BARVENÍ ELEKTROFORETICKÉHO GELU STŘÍBREM NEBO COOMASSIE BLUE R-250

1, Stříbro:

Gel se fixuje nejméně hodinu v roztoku 40 % ethanolu, 10 % kyseliny octové a 50 % H₂O za mírného třepání. Poté je gel promýván řadou roztoků v následujícím režimu:

2 x 30 % ethanol (20 min.), 1 x destilovaná voda (20 min.), 1 x 0,02 % Na₂S₂O₃ (1 min.), 3 x destilovaná voda (30 s), 1 x vychlazený 0,1 % AgNO₃ a 0,02 % formaldehyd (20 min.), 4 x destilovaná voda (30 s). Pro vyvinutí barvy je gel inkubován v roztoku 3 % Na₂CO₃ a 0,05 % formaldehydu tak dlouho, dokud se bílkoviny nezbarví do žluta. Poté se opět promyje vodou (30 s). Barevný vývoj je ukončen inkubací gelu v roztoku 5 % kyseliny octové. Gel se ještě třikrát promyje vodou (10 min.) a uchovává se v roztoku 1 % kyseliny octové.

2, Coomassie Blue R-250:

Gel byl promýván 2 h. roztokem 45 % etanolu, 10 % kyseliny octové, 45% H₂O a 0,5g/l Coomasie Blue R-250 za mírného třepání. Poté byl odbarven roztokem 25 % etanolu, 10 % kyseliny octové a 65 % H₂O.

3.4.10.3 ZYMOGRAM

Do běžného gelu pro SDS PAGE elektroforézu byl zabudován 0,2 % substrát (CM-chitin, CM-xylan) tak, že místo 4,4 ml destilované vody byl použit 0,2 nebo 0,4 % CM-chitin či CM-xylan. Vzorky byly připraveny obvyklým způsobem. Po skončení elektroforézy byl gel promýván 3 x 15 min. 1 % tritonem a 3 x 15 min. 100 mM fosfátovým pufrem pH 6. Poté byl inkubován ve 100 mM fosfátovém pufru pH 6 při 39°C po různě dlouhou dobu. Nakonec byl 20 min. barven v 0,1 % roztoku Kongo červeně a odbarvován 3 x 15 min. 1M NaCl.

Při stanovování xylosidasy byl gel po skončení elektroforézy promýván 3 x 15 min. 1 % tritonem a 3 x 15 min. 100 mM fosfátovým pufrem pH 6. Poté byl gel přelit roztokem 4-methylumbelliferyl-β-D-xylopyranosidu (300 µg/ml ve fosfátovém pufru pH 6, 5ml na gel). Poté byl inkubován při 39°C po různě dlouhou dobu. Detekce byla provedena pod UV světlem.

3.4.10.4 PŘÍPRAVA CM-CHITINU A CM-XYLANU ^[211]

Na výrobu CM-chitinů byl použit chitin od firmy Sigma-Aldrich (USA), na výrobu CM-xylanů byl použit xylan od téže firmy. 10 g chitinů či xylanů bylo rozpuštěno v 125 ml 65% NaOH a mícháno 1 hod. při 20°C. Poté byl chitin (xylan) centrifugován ve skleněných kyvetách 30 min. při 20°C při 4250 ot/min. Sediment byl resuspendován ve 125 ml izopropanolu s 15g kyseliny monochloroctové a roztok byl inkubován po dobu 1 hod. při 20°C. Poté byla směs znovu centrifugována ve skleněných kyvetách 30 min. při 20°C při 4250 ot/min. Sediment byl resuspendován ve 125 ml izopropanolu a 1 hod. míchán při 20°C. Poté byl převeden do 1 l destilované vody a pH bylo upraveno na 7. Takto připravená směs byla míchána po dobu 24 hod. při 20°C. Po zcentrifugování 30 min. při 20°C při 4250 ot/min byl supernatant dialyzován 24 hod. při 4°C proti destilované vodě. Během této doby byla destilovaná voda 2x vyměněna. Přechištěný supernatant byl poté lyofilizován a z takto připraveného suchého CM-chitinů a CM-xylanů byl připraven 0,5% CM-chitin (CM-xylan) ve vodě a vsterilizován.

3.4.11 Charakterizace endochitinolytického enzymu

3.4.11.1 Stanovení optimálního pH

Optimální pH, tedy hodnota pH, při níž fungální endochitinasa vykazuje nejvyšší enzymatickou aktivitu, bylo stanovováno v rozmezí pH 3 až pH 8. V reakční směsi pro stanovení aktivity enzymu byl 100 mM fosfátový pufr (pH 6) nahrazen směsí 0,2 M Na₂HPO₄·2H₂O a 0,1 M kyseliny citrónové o různém pH (Δ pH= 1), přičemž ostatní reakční podmínky zůstaly nezměněny.

3.4.11.2 Stanovení stability enzymu při různém pH

Stabilita fungální endochitinasy v prostředích o různém pH byla stanovována obdobně jako v kapitole 3.4.1 s tím rozdílem, že reakční směs byla navíc inkubována po dobu 3 h. při 40°C v pufrech, jejichž pH se pohybovalo v rozmezí pH 3 až pH 8. Poté byla enzymová aktivita stanovena běžným způsobem.

3.4.11.3 Stanovení teplotního optima

Optimální teplota, při níž fungální endochitinasa vykazuje nejvyšší enzymatickou aktivitu, byla stanovována v rozmezí 10 až 80°C. Při těchto teplotách byla reakční směs inkubována 60 min. a poté byla aktivita enzymu stanovena běžným způsobem.

3.4.11.4 Stanovení teplotní stability enzymu

Stabilita fungální endochitinasy při různých teplotách byla stanovována obdobně jako v kapitole 3.4.1 s tím rozdílem, že endochitinasa byla před stanovením inkubována v rozmezí teplot 10 až 80°C po dobu 1 hod. Poté byla enzymová aktivita stanovena běžným způsobem.

3.4.11.5 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu enzymu

Vliv 14 chemikálií na aktivitu fungální endochitinasy byl studován za standardních reakčních podmínek poté, co byl studovaný vzorek vystaven působení vybraných chemikálií ve dvou různých koncentracích (1mM a 10 mM roztoky) po dobu 60 min. při 40°C ve 100 mM fosfátovém pufru pH 6. K experimentu jsme použili tyto chemikálie:

1 mM CoCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM BaCl_2 , 1 mM a 10 mM KCl, 1 mM a 10 mM MgCl_2 , 1 mM a 10 mM L-cystein, 1 mM a 10 mM dithiothreitol, 1 mM a 10 mM o-fenantrolin, 1 mM a 10 mM thimerosal, 1 mM a 10 mM iodoacetamid, 1 mM a 10 mM SDS, 1 mM phenylmethyl, 1 mM a 10 mM kyselina iodoctová, 1 mM a 10 mM EDTA.

3.4.11.6 Substrátová specifita

Pro studium substrátové specifity fungální endochitinasy byla měřena enzymová aktivita za standardních reakčních podmínek, avšak působení enzymu byl vystaven chitin pocházející z rozdílných přírodních zdrojů nebo různé formy chitosanu. Všechny sledované substráty - koloidní chitin, DDD chitin ze sepie, DDD chitin z houby, chitosan aspartát, chitosan glutamát, chitosan a chitosan peros – byly připraveny jako 0,5 % roztoky ve vodě.

3.5 Čištění proteinů pomocí ultrafiltrační cely a gelové chromatografie

Pro tento pokus byla použita kultura anaerobní houby narostlá na médiu M2 ^[185]. 4denní kultura byla centrifugována 45 min. při 15 000 RPM při 5°C. Poté byl supernatant 28x zahuštěn ultrafiltrací pomocí ultrafiltrační cely 8400 (Amicon) pod tlakem helia 300 kPa. Po celou dobu zahušťování byla cela chlazena ledem. Pro zahušťování byla použita ultrafiltrační membrána, která propouští bílkoviny menší než 10 kDa.

Parametry použité cely:

ultrafiltrační cela model 8400 firmy Amicon

kapacita: 400 ml

minimální použitý objem: 10 ml

průměr membrány: 76 mm

plocha membrány: 41,8 cm²

hmotnost: 710 g

maximální použitelný tlak: 530 kPa

maximální diafiltrační tlak: 390 kPa

Parametry použité membrány:

ultrafiltrační membrána firmy Amicon

materiál: polyethersulfon

průměr: 76 mm

velikost: 10 kDa

membrána byla uchovávána v 0,02 % roztoku azidu sodného. Při použití nové membrány bylo potřeba membránu opláchnout v destilované vodě a nechat 1 hodinu namočenou v několikrát vyměněné destilované vodě, neboť membrána je konzervována glycerinem a azidem sodným

Takto připravený vzorek byl použit pro další čištění proteinů.

Pro čištění proteinů pomocí gelové chromatografie byl použit SEPHADEX G100, který byl před vlastní prací namočen do fosfátového pufru pH 6 a při 40°C nechán den bobtnat. Poté

byla připravena kolona o průměru 1 cm a výšky sloupce 36 cm. Nahoře byl sloupec zakryt fritou. Kolona byla uchovávána při pokojové teplotě po promytí fosfátovým pufrem pH 6 s obsahem 0,02% azidu sodného. Rychlost protékání kolony byla 0,8 ml/min.

3.6 Fylogenetická analýza endoxylanase anaerobních hub

Pro tento pokus byla použita 4 denní kultura houby rodu *Anaeromyces* KF8 narostlá na médiu M10^[35] s cellobiosou (o koncentraci 4g/l) jako zdrojem uhlíku. Genomická DNA byla izolována pomocí komerčního kitu PowerSoilTM DNA Kit (MoBio Laboratories). Dále byly do této analýzy zařazeny i další anaerobní houby uložené ve sbírce mikroorganismů ÚŽFG AV ČR, a to kmeny *Anaeromyces* Zu2 a JF1 izolované z trusu bisona a jelena a kmeny *Orpinomyces* Zu1, KF1, KF2, KF3, KF5, KF6 izolované z trusu bisona a krávy. Nepracovalo se však přímo s živými kmeny, ale pouze s jejich DNA. Úseky genů kódujících xylanase byly amplifikovány z genomické DNA uvedených anaerobních hub pomocí primerů XynAf – XynAr^[110]. PCR reakce probíhala v teplotním režimu podle Fliegerové a kol.^[59] na termocykléru T-personel Combi (Biometra). Amplifikované úseky byly naklonovány do plasmidu pCR4TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) a sekvenční analýza byla provedena na přístroji 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) pomocí kitu ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získaná data byla analyzována fylogenetickými distančními (Neighbor-joining) a znakovými (maximální parsimonie a věrohodnost) metodami pomocí programu PAUP na ÚŽFG AV ČR. Rozsáhlá fylogenetická analýza provedená metodou RaxML-HPC v. 7.2.5. (Randomized Accelerated Maximum Likelihood^[170]) byla provedena ve spolupráci s Ústavem mikrobiologie University F. Schillera v Jeně (Německo). Námi vyprodukované sekvence byly porovnány s údaji v genové bance a celkový dataset obsahoval 194 sekvencí.

3.7 Popis nového izolátu

3.7.1 Mikroskopické pozorování

Dokumentace mycelia: Anaerobní houba KF9 izolovaná metodou popsanou v kapitole 3.3.2 byla focena pomocí mikroskopu LEICA DM 2500 s kamerou LEICA DFC 480 při barvení

pomocí lugolu (roztok 1: 20 g I₂, 25 ml dH₂O, 4 g NaOH, roztok 2: 1 g KI, 975 ml dH₂O, roztoky smíchány v poměru 1:1) při různém zvětšení v průběhu růstu. Pro pozorování buněčných jader byla použita 4denní kultura narostlá na M10 s cellobiosou (4 g/l) jako zdrojem uhlíku. Vzorek byl obarven roztokem DAPI (0,05 % v 50 mM Tris-HCl pH 7,2). Vzorek byl ponechán 5 min. ve tmě při pokojové teplotě a poté byla jádra focena použitím 365 a 420 nm filtru.

Dokumentace zooospor: Jednodenní kultura byla přefiltrována přes 15 µm filtr a centrifugována při 1000 g po dobu 5 min. při 4°C. Sediment byl zhomogenizován přidáním 100 µl fixačního pufru (0,1 M kakodyl sodný, 0,02 % CaCl₂, 5 % glutaraldehyd, 2 % formaldehyd) a inkubován 30 min. na ledu. Po inkubaci byl vzorek nanesen na mikroskopické sklíčko, obarven lugolem nebo DAPI a pozorován.

Kolonie v agaru: Anaerobní houba KF9 byla kultivována v médiu M10 s koncentrací glukosy 4 g/l jako zdrojem uhlíku ztuženém přidavkem agaru v koncentraci 1,5 %.

3.7.2. Stanovení konečných metabolitů

Houba KF9 byla kultivována 4 dny v médiu M10 při 39°C. Poté bylo médium zcentrifugováno 10 min. při 4000 ot/min. při 4°C. Supernatant byl použit pro stanovení koncových fermentačních metabolitů. Pro plynovou chromatografii byl vzorek připraven smícháním 750 µl supernatantu a 250 µl 21,25 % kyseliny fosforečné.

Chromatografické stanovení těkavých mastných kyselin bylo provedeno na plynovém chromatografu Agilent GC 6890N (Hewlett Packard) za následujících podmínek: kolona ZEBRON ZB-FFAP 30 m x 0,25 mm ID 0,25 µm, mobilní fáze H₂, split poměr 20:1, teplota injektoru 230°C, teplota detektoru (FID) 300°C. Při měření byl použit následující teplotní režim: počáteční teplota 80°C po dobu 1 min., poté nárůst 20°C.min⁻¹ na teplotu 120°C, která byla udržována 2 min., poté nárůst 6,13°C.min⁻¹ na teplotu 205°C, ta byla udržována 2 min. a poté byl proveden nástřik 1 µl vzorku. Profily těkavých mastných kyselin byly identifikovány a kvantifikovány pomocí programu Agilent ChemStation System. Pro kalibraci byla použita následující směs těkavých mastných kyselin: acetát, propionát, isobutyrát, butyrát, isovalerát, valerát, kapronát.

3.7.3. Stanovení složení mastných kyselin v buněčné stěně

Houba KF9 byla kultivována 4 dny v médiu M10 při 39°C. Poté bylo médium zcentrifugováno 10 min. při 4000 ot/min. při 4°C. Sediment byl použit pro stanovení složení mastných kyselin. Metyl estery mastných kyselin byly připraveny lipidovou extrakcí a transesterifikací metodou Stahla a Kluga ^[169]. Chromatografické stanovení metyl esterů příslušných mastných kyselin bylo provedeno na plynovém chromatografu Agilent GC 6890N (Hewlett Packard) za následujících podmínek: kolona SP-2560 100 m x 0,25 mm ID 0,20 µm, mobilní fáze H₂, split poměr 100:1, teplota injektoru 250°C, teplota detektoru (FID) 260°C. Při stanovení byl použit následující teplotní režim: počáteční teplota 140°C po dobu 5 min., poté nárůst 4°C.min⁻¹ na teplotu 240°C, která byla udržována po dobu 15 min. a poté byl proveden nástřik 1 µl vzorku. Pro kalibraci byla použita směs FAME C8-C24. Profily mastných kyselin byly identifikovány a kvantifikovány pomocí programu Agilent ChemStation System.

3.7.4. Sekvenční analýza úseků ribozomální DNA

Pro izolaci DNA z anaerobní houby KF9 byla použita 4 dny stará kultura narostlá na médiu M10 ^[35] se 4 g/l glukosy. DNA byla izolována pomocí komerčního kitu PowerSoil DNA Kit a z genomické DNA byly poté amplifikovány fragmenty za použití primerů NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') – NS2 (5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3') ^[207], ITS1 - ITS4 a NL1 - NL4 pomocí polymerázové řetězové reakce. PCR produkty byly sekvenovány a porovnány s databází NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Tyto sekvence byly seřazeny (alignment) v programu MEGA5 ^[178], byl použit algoritmus "MUSCLE". Fylogentický stromek byl vytvořen metodou Neighbor-joining. Správnost stromku byla ověřena technikou "bootstrap" (opakování 500). Z této analýzy vyplynulo, že neznámý kmen KF9 patří do rodu *Piromyces*.

4. VÝSLEDKY

4.1 Screening hydrolytických enzymů

V úvodním experimentu jsme provedli „screening“ anaerobních hub na nejvýznamnější hydrolytické enzymy. Do pokusu byly zařazeny 4 rody bachorových hub: *Anaeromyces* KF8, *Orpinomyces* KF7, *Caecomycetes* OF1 a zatím neznámá houba s označením KF9. Houby byly kultivovány po dobu 72 h. při teplotě 39° C v anaerobním mediu M10^[35] s cellobiosou (4g/l) jako zdrojem uhlíku. Aktivita enzymů byly stanoveny v kultivačním médiu i intracelulárně a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

U všech sledovaných rodů hub se jako nejvýznamnější enzym s nejvyšší aktivitou ukázala být endoxylanasa s hodnotami v rozmezí 1303 – 17748 pkat/mg proteinu. Obecně dosahovala endoxylanasa vyšších hodnot v extracelulární frakci, pouze u houby *Orpinomyces* KF7, byly aktivity endoxylanasy v obou frakcích srovnatelné. V dalších experimentech se však potvrdilo, že i u této houby je xylanasa produkována především extracelulárně (viz kapitola 4.4.1, obr. 14). Druhým významným enzymem je amylasa. Zde se projevíly velké rozdíly mezi jednotlivými rody. Nejvyšší amylasové aktivity byly naměřeny pro rod *Anaeromyces* (6758 pkat/mg proteinu), zatímco amylasova aktivita rodu *Caecomycetes* (405 pkat/mg proteinu) byla téměř 17 x nižší. U houby KF8 rodu *Anaeromyces* byla také překvapující vysoká aktivita pektátlyasy v extracelulární frakci (3915 pkat/mg proteinu). Tyto hydrolytické aktivity naznačují, že houby rodu *Anaeromyces*, o jejichž roli v bachorovém prostředí se mnoho neví, mají svou nezastupitelnou roli v anaerobní fermentaci u přežvýkavců. Druhý velmi málo prostudovaný rod *Caecomycetes* zastoupený v této práci kmenem OF1 zase vykazoval překvapivě nejvyšší extracelulární specifické aktivity β -xylosidasy, β -glukosidasy a β -galaktosidasy a také nejvyšší hodnotu lipasy. Mezi studovanými kmeny měl také nejvyšší aktivitu celulasu a cellobiohydrolasy. Všechny houby vykazovaly poměrně vysoké aktivity intracelulárně produkováné endochitinasy, jejímuž podrobnějšímu studiu se věnují následující kapitoly. Mezi málo aktivní až nedetekovatelné enzymy patří u všech sledovaných hub α -xylosidasa a exochitinasa s aktivitami max. do 102 pkat/mg proteinu. Obecně jsme očekávali vyšší aktivity celulasu a endoglukanasy a jejich relativně nízké hodnoty byly neočekávané.

Tab. 8 Srovnání specifických aktivit enzymů u bachorových hub

Srovnání enzymů u bachorových hub (pkat/mg proteinu)								
	<i>Anaeromyces</i> - KF8		<i>Orpinomyces</i> - KF7		<i>Caecomycetes</i> - OF1		Anaerobní houba -KF9	
	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární
α -xylosidasa	44,22	36,46	61,00	46,74	101,97	16,91	nd	nd
β -xylosidasa	249,17	369,63	235,98	4742,80	1470,45	1820,15	756,68	4611,09
α -glukosidasa	143,62	23,07	163,43	48,46	71,17	10,67	166,59	236,08
β -glukosidasa	276,84	59,63	1325,36	1673,64	4645,03	1436,24	3165,09	1989,23
celobiohydrolasa	79,62	14,47	151,22	139,74	478,04	95,31	184,36	18,65
N-acetylglukosaminidasa	78,83	107,55	15,61	16,48	83,96	42,72	14,47	75,62
mannosidasa	43,70	38,14	19,72	16,14	30,77	52,67	90,47	347,00
exochitinasa	nd	15,34	nd	29,69	nd	nd	31,50	89,63
cellulasa	505,65	430,58	668,71	832,94	1055,17	423,50	1026,53	327,14
xylanasa	10473,79	1303,08	5985,05	7600,81	11157,43	2685,54	17747,84	2816,89
amylasa	6758,36	129,31	2076,14	415,46	405,10	65,17	3542,68	1500,55
endoglukanasa	703,13	86,59	619,20	77,63	336,35	490,93	916,99	272,62
endochitinasa	706,35	1088,31	1433,80	1808,11	775,92	1084,64	419,51	657,41
pectinhydrolasa	712,43	135,96	57,84	107,89	318,74	168,54	586,17	426,89
laminarinasa	187,73	80,77	244,89	279,25	135,07	228,1	561,5	73,09
deacetylasa	427,72	19,81	102,33	45,74	257,68	184,53	319,62	558,91
pectátlyasa	3915,46	nd	889,65	nd	1051,47	nd	2405,31	1503,29
lipasa (μ kat/mg)	10,91	21,74	16,47	6,63	47,45	8,13	41,97	22,84
β -galaktosidasa	258,52	98,22	918,30	616,53	1224,98	364,33	320,45	218,59
Proteasa (ng AZO/hod/ng protein)	336,88	66,03	268,43	91,4	373,13	214,76	419,80	406,01

4.2 Chitinolytický komplex

Do pokusu byly zařazeny 2 rody polycentrických bachorových hub: *Anaeromyces* – KF8, *Orpinomyces* KF7. Houby byly kultivovány po dobu 72 h. při teplotě 39°C v anaerobním mediu M10^[35] s glukosou (4g/l) jako zdrojem uhlíku. Aktivita čtyř enzymů štěpících různým způsobem chitin byly stanoveny ve 3 frakcích. Kultura byla zcentrifugována při 5000 RPM po dobu 20 min. při 4°C. Supernatant byl nazván extracelulární frakcí. Mycelium (1 g) bylo resuspendováno v 5 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6) a homogenizováno 5 min. na ledě (amplituda 60, puls 1s). Homogenát byl centrifugován při 12000 RPM 10 min při 4°C. Supernatant byl nazván cytosolová frakce. Pelet byl za stejných podmínek resuspendován a homogenizován. Homogenát byl centrifugován při 12000 RPM 10 min při 4°C a supernatant byl nazván frakcí z buněčných stěn. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 9. Nejvýznamnějším enzymem celého chitinolytického systému je endochitinasa, jejíž nejvyšší aktivity byly naměřeny v intracelulární cytosolové frakci. Hodnoty tohoto enzymu v této frakci naměřené u houby rodu *Orpinomyces* (548 pkat/mg proteinu) přitom byly více než dvakrát vyšší než u rodu *Anaeromyces* (223 pkat/mg proteinu). Endochitinasa dosahovala mnohonásobně vyšších hodnot než ostatní enzymy podílející se na rozkladu chitinu. Nejméně aktivním enzymem byla shledána exochitinasa s hodnotami max. 29 pkat/mg proteinu.

Tab. 9 Aktivita enzymů chitinolytického komplexu u houby rodu *Anaeromyces* a *Orpinomyces*

Aktivita enzymů [pkat/mg]	<i>Orpinomyces</i>			<i>Anaeromyces</i>		
	cytosol	bun.stěny	médium	cytosol	bun.stěny	médium
Endochitinasa	547,58	308,21	95,64	223,19	73,21	50,17
N-acetylglucosaminidasa	60,41	19,22	1,01	10,31	11,59	18,47
Exochitinasa	29,04	13,60	nd	0,80	nd	16,83
Deacetylasa	0,00	3,05	31,34	1,56	34,16	64,82
Proteasa [ng AZO/hod/ng protein]	39,58	27,49	8,42	52,27	68,08	18,40

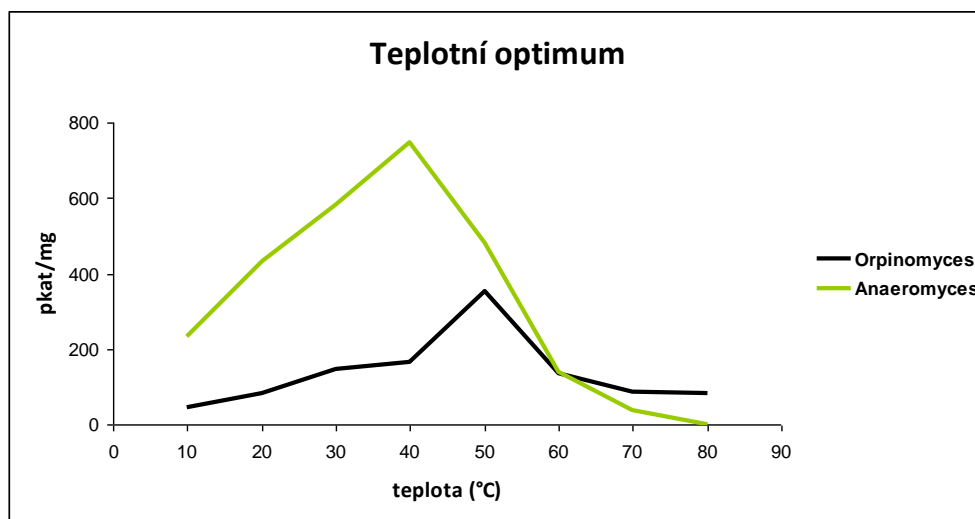
4.3 Charakterizace endochitiny

4.3.1 Teplotní optimum a teplotní stabilita

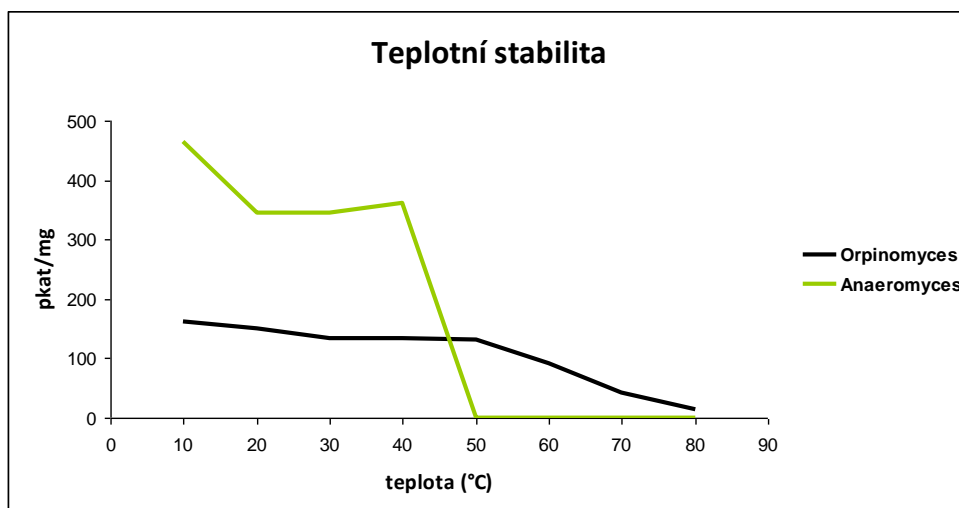
Aktivita enzymu narůstá se vzrůstající teplotou až do bodu, kdy termální energie začne narušovat proteinové vazby, až se nakonec zhroutí celá konformace a dojde k denaturaci enzymu. Optimální reakční teplota je proto významnou charakteristikou enzymu.

Teplotní stabilita endochitiny byla měřena způsobem, že vzorky byly vystaveny působení různých inkubačních teplot po dobu 1 hodiny. Enzymové aktivity jsme proměřili u dvou rodů anaerobních bahorových hub: *Anaeromyces* KF8 a *Orpinomyces* KF7.

Výsledky jsou názorně vykresleny na obrázku 8 a 9. Z naměřených hodnot vyplývá, že optimální teplota endochitiny u houby rodu *Orpinomyces* byla 50°C a tento enzym je stabilní do 50°C. Jak teplotní optimum tak teplotní stabilita je u rodu *Anaeromyces* o 10°C nižší → 40°C.



Obr.8 Teplotní optimum endochitiny u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*.



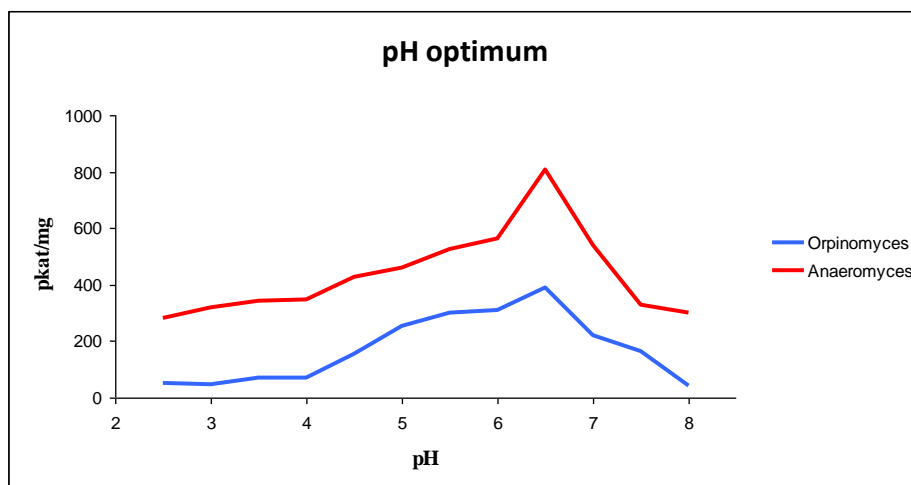
Obr.9 Teplotní stabilita endochitinasy u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*.

4.3.2 pH optimum a pH stabilita

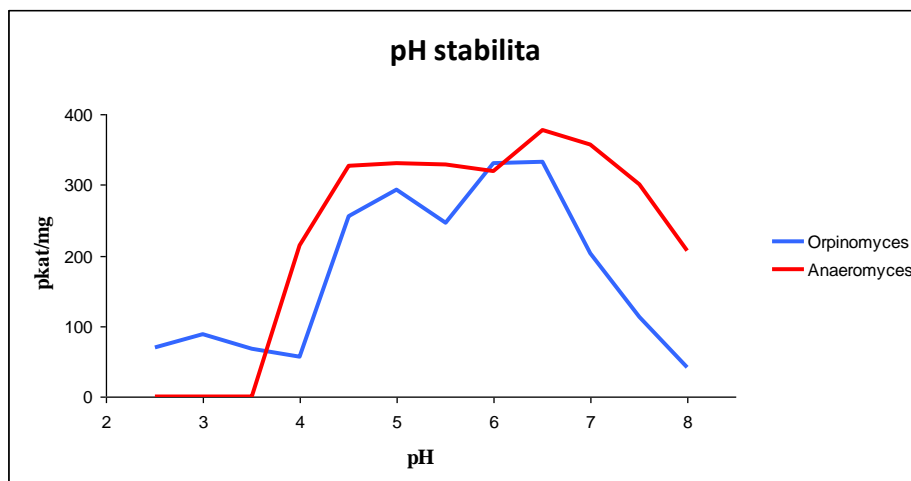
Každý enzym vyžaduje pro dosažení optimální účinnosti specifickou koncentraci vodíkových iontů H^+ , a to nejen proto, že reakční mechanismus vyžaduje kyselé či zásadité prostředí, ale také proto, že konformace proteinu závisí na náboji vazebných skupin.

Stabilita enzymu za různých reakčních podmínek je také jednou z charakteristik enzymu. Měřili jsme aktivitu endochitinasy při různém pH, v tomto experimentu však byla inkubační doba prodloužena na tři hodiny. Zjištěné enzymové aktivity jsou graficky znázorněny na obrázku 10 a 11.

Z výsledků lze vyčíst, že endochitinasy jsou stabilní v rozmezí pH 4-7, při pH 8 se projevuje výrazný pokles aktivit a při pH 3 dochází k denaturaci enzymu.



Obr.10 pH optimum endochitinasy u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*.



Obr.11 pH stabilita endochitinasy u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*.

Pro endochitinasy hub rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces* byly tedy zjištěny rozdíly jak ve specifických aktivitách, tak i v účinku teploty na aktivitu a stabilitu enzymu. Avšak pH optimum a pH stabilita je pro oba rody a jejich endochitinasy srovnatelná.

4.3.3 Substrátová specifita

Substrátová specifita vyjadřuje afinitu enzymu k různým substrátům, v našem případě schopnost fungální endochitinasy hydrolyzovat chitin pocházející z jiných přírodních zdrojů. Zjišťovali jsme aktivitu endochitinasy v cytosolové frakci u rodu *Orpinomyces* KF7 a *Anaeromyces* KF8. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10.

Z nich vyplývá, že oba rody hub nejlépe hydrolyzují houbový chitin (chitin získaný z buněčných stěn hub) a tato aktivita byla stanovena jako 100 %. Endochitinasa u obou rodů dokázala rozložit všechny studované substráty, pro rod *Orpinomyces* byl nejvhodnější DDD-chitin, CM-chitin a chitosan sukcinát, nejméně vhodným substrátem byl CM-chitosan. Rod *Anaeromyces* naopak nejlépe hydrolyzoval koloidní chitin, DDD-chitin a chitosan glutamát, nejhůře byl hydrolyzován koloidní chitosan, pro nějž byla naměřena vůbec nejnižší aktivita.

Tab. 10 Substrátová specifita hub rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*

Substrát	Relativní aktivita(%)	
	<i>Orpinomyces</i>	<i>Anaeromyces</i>
Chitin připravený z hub	100,00	100,00
Chitosan	67,88	70,60
Koloidní chitosan	42,07	26,12
CM-chitosan	32,60	78,53
DDD-chitin	93,77	87,99
DDD chitin sépie	80,54	66,52
CM-chitin	93,02	55,26
Koloidní chitin	68,79	90,62
Chitosan sukcinát	90,69	41,98
Chitosan glutamát	42,89	86,81
Chitosan aspartát	70,79	82,30

4.3.4 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinasy

Aktivitu enzymu mohou ovlivnit látky, které blokují aktivní místo nebo mění konformaci enzymu, která vede ke změně katalytické aktivity. Studovali jsme proto aktivační či inhibiční účinek 17 chemikálií na aktivitu endochitinasy u dvou rodů anaerobních hub: *Orpinomyces* KF7 a *Anaeromyces* KF8. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech. 100 % aktivita je přitom aktivita endochitinasy, která byla hodinu inkubována při 40°C jen v čistém 100 mM fosfátovém pufru pH 6 bez přídavku jakéhokoliv iontu nebo chemikálie.

Endochitinasu houby *Anaeromyces* byla více ovlivněna působením iontů a chemikálií než endochitinasu houby rodu *Orpinomyces*. Endochitinasy obou hub byly inhibovány působením iontů Hg^{2+} a 1 mM Mn^{2+} výrazně snižovalo aktivitu tohoto enzymu zejména u rodu *Orpinomyces*. Inkubace s iontem Co^{2+} vedla k inhibici enzymu v průměru o 30 %. Ionty Mg^{2+} a Fe^{2+} měly naopak aktivační účinek. Endochitinasu houby rodu *Orpinomyces* byla aktivnější při působení 10 mM MgCl_2 dokonce o 30 %, tento jev se však neprojevil u *Anaeromyces*.

Chemikálie také velice ovlivnily aktivitu endochitinasy a *Anaeromyces* byla opět citlivější ke všem testovaným látkám. 10 mM SDS skoro deaktivovala endochitinasu. 10mM thimerosal

snížil aktivitu o 70 %. Výrazným inhibitorem se ukázala být i EDTA u endochitinasy z houby rodu *Anaeromyces*, která při 10 mM koncentraci vyvolala pokles endochitinasové aktivity buněčných stěn o 70 %. Naopak 1mM iodoacetamid zvýšil aktivitu endochitinasy stejně jako kyselina iodoctová, která aktivovala endochitinasu houby rodu *Anaeromyces* o 20%.

Tab. 11 Vliv iontů a chemikálií na aktivitu endochitinasy u houby rodu *Anaeromyces* a *Orpinomyces*

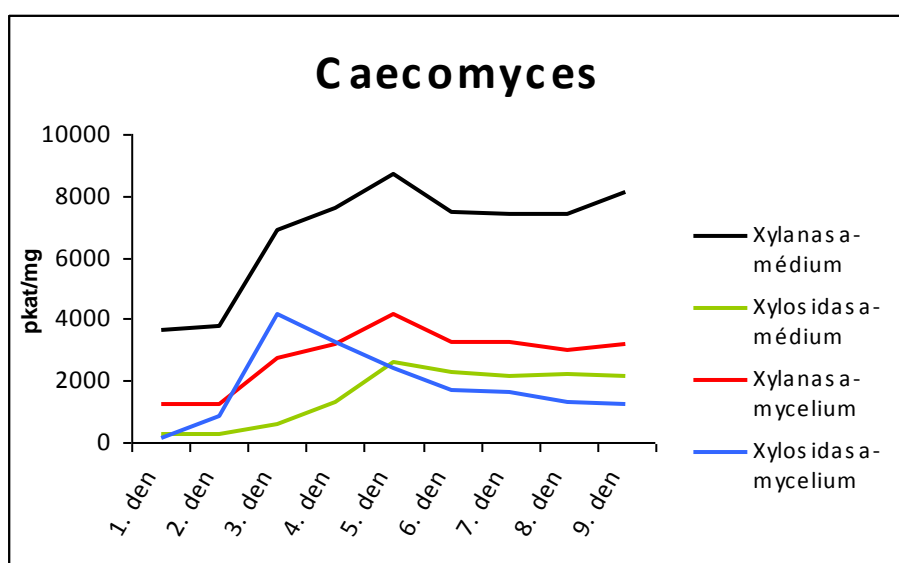
Ionty kovů	Koncentrace (mM)	Relativní aktivita(%)	
		<i>Orpinomyces</i>	<i>Anaeromyces</i>
bez		100,00	100,00
MnCl ₂	1	41,92	70,16
KCl	1;10	99,23;102,20	109,04;94,33
HgCl ₂	1;10	78,57;27,08	21,94;5,30
BaCl ₂	1	110,39	108,26
CoCl ₂	1	82,17	79,13
Ionty kovů	Koncentrace (mM)	Relativní aktivita(%)	
		<i>Orpinomyces</i>	<i>Anaeromyces</i>
MgCl ₂	1;10	112,90;129,93	106,88;97,50
FeCl ₃	1;10	112,20;109,52	132,83;114,20
Chemikálie	Koncentrace (mM)	Relativní aktivita(%)	
		<i>Orpinomyces</i>	<i>Anaeromyces</i>
L-cystein	1;10	93,64;81,54	70,13;42,50
EDTA	1;10	94,28;87,75	90,25;28,75
SDS	1;10	82,19;0,00	29,54;5,79
dithiothreitol	1;10	86,96;74,87	71,25;27,63
o-phenantrolin	1;10	104,48;83,84	99,11;41,32
kyselina iodoctová	1;10	103,99;95,07	120,75;71,50
thimerosal	1;10	78,83;33,17	54,00;30,00
merkapt ethanol	1;10	92,26;67,26	55,50;34,50
idoacetamid	1;10	110,39;100,72	118,50;88,00
phenylmethyl- sulfonyl fluorid	1	85,95	63,38

4.4 Xylanolytický systém

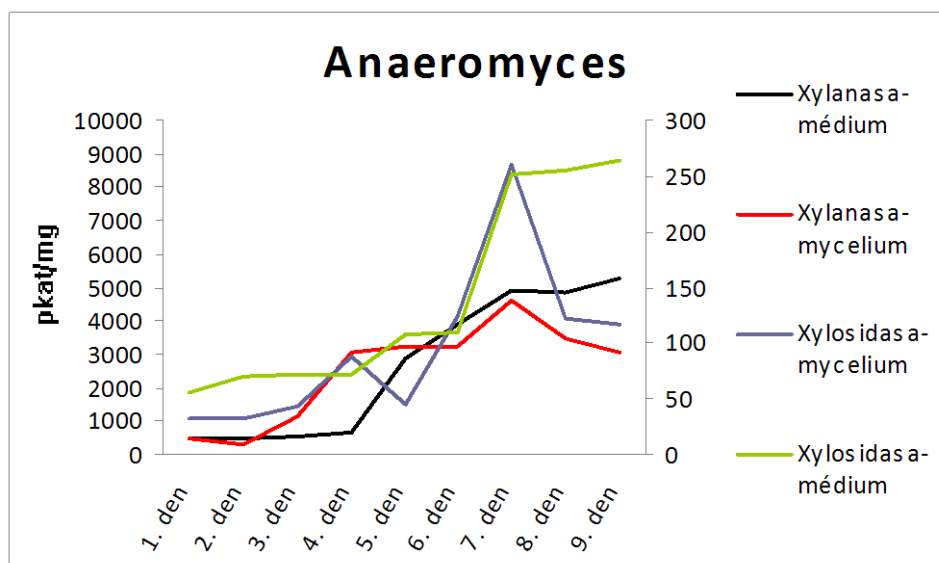
4.4.1 Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u anaerobních hub

U anaerobních bacherových hub rodu *Caecomyces* OF1, *Orpinomyces* KF7 a *Anaeromyces* KF8 jsme studovali produkci endoxylanasy a xylosidasy v průběhu kultivace. Naším cílem bylo zjistit, v jakém časovém úseku po inokulaci houby dosahují tyto enzymy maximálních hodnot. Kmeny OF1, KF7 a KF8 byly kultivovány po dobu 9 dnů na mediu M10 s glukosou (4 g/l) při 39°C. Každý den ve stejnou dobu byly 3 vzorky houby a média odebrány a zamraženy. V intracelulární a extracelulární frakci byla poté stanovena endoxylanasová a xylosidasová aktivita podle postupu uvedeného výše. Na obrázku 12 je znázorněna dynamika obou enzymů u rodu *Caecomyces*, na obrázku 13 u rodu *Anaeromyces* a na obrázku 14 u rodu *Orpinomyces*.

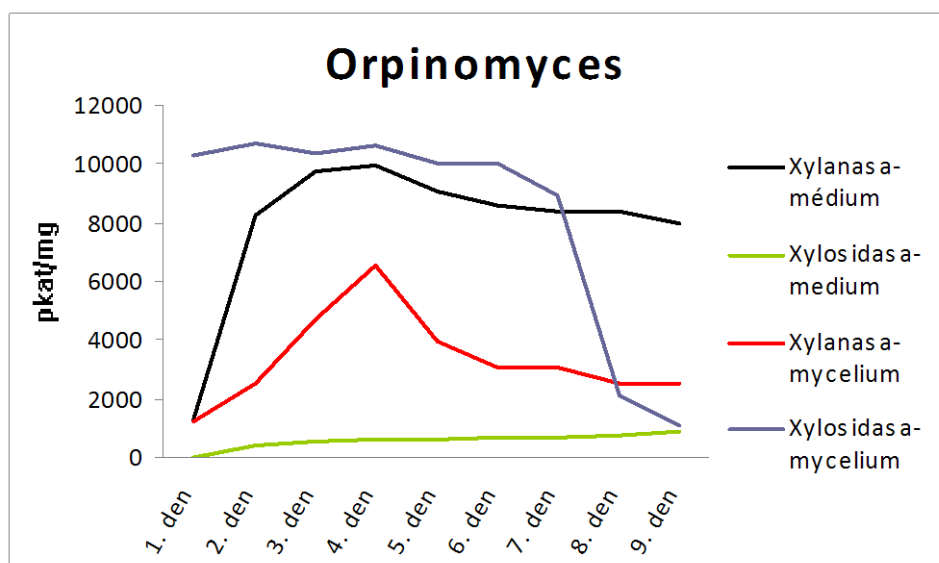
Z grafů vyplývá, že aktivita endoxylanasy u rodu *Caecomyces* dosahuje nejvyšších hodnot pátý den růstu a aktivita xylosidasy třetí den růstu. U rodu *Anaeromyces* oba enzymy dosahovaly nejvyšších hodnot sedmý den růstu a u rodu *Orpinomyces* již čtvrtý den růstu. Opět se při těchto experimentech potvrdilo, že endoxylanase je produkována převážně extracelulárně, zatímco xylosidasa je vázána na mycelium a její hlavní produkce je tedy intracelulární.



Obr. 12 Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u rodu *Caecomyces*



Obr. 13 Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u rodu *Anaeromyces*



Obr. 14 Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u rodu *Orpinomyces*

4.4.2 Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na zdroji uhlíku v médiu

Houby rodů *Anaeromyces* KF8, *Orpinomyces* KF7, *Caecomyces* OF1, *Neocallimastix* OF2 a neznámá houba KF9 byly kultivovány při 39°C v médiu M10. Jako zdroje uhlíku v médiu byly použity substráty glukosa, cellobiosa, phospho-celulosa, mc-celulosa, xylosa, hemicelulosa, celulosa, cm-celulosa, cm-xylan, škrob, laktosa, arabinosa a xylan. Všechny použité substráty byly použity v koncentraci 4g/l. Aktivita enzymů byla stanovována v intracelulární a extracelulární frakci. Hodnoty aktivit xylanasy uvádí tabulka 12, aktivity xylosidas jsou uvedeny v tabulce 13. Isoformy endoxylanasy indukované či inhibované použitými substráty byly studovány pomocí SDS-elektroforézy s CM-xylanem zakomponovaným do gelu. Obr. 15 až 19 ukazují zymogramy xylanasy při kultivaci rodů *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix* a neznámé houby KF9 na různých zdrojích uhlíku.

Tab. 12 Aktivita endoxylanasy v závislosti na zdroji uhlíku v médiu u různých rodů hub

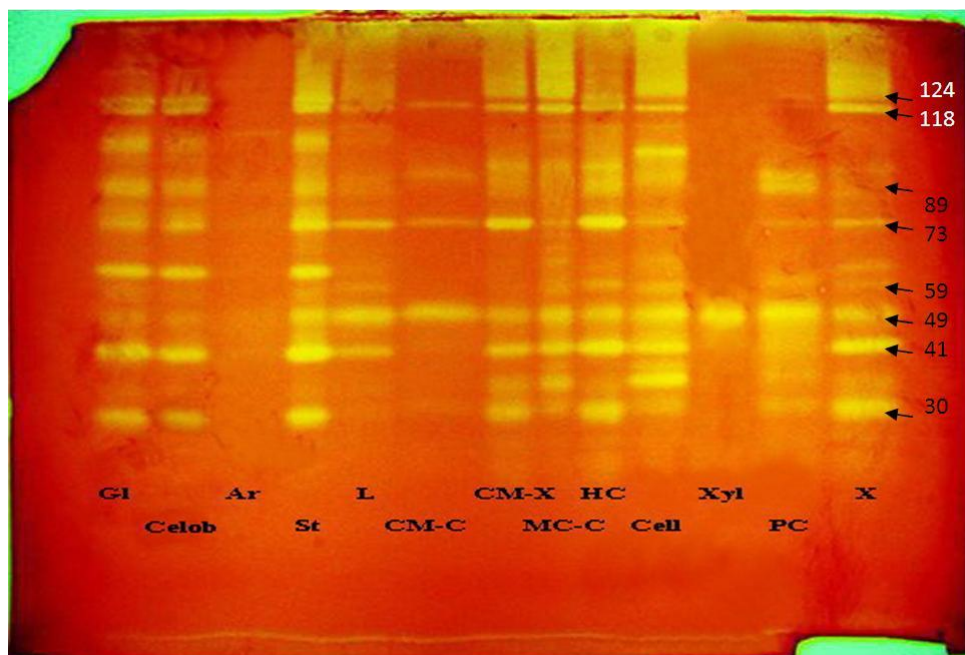
Srovnání specifických aktivit xylanasy (pkat/mg proteinu)										
	<i>Anaeromyces</i> - KF8		<i>Orpinomyces</i> - KF7		<i>Caecomyces</i> - OF1		<i>Neocallimastix</i> - OF2		Anaerobní houba -KF9	
	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární
glukosa	7354,37	1404,44	15508,00	2627,96	9749,41	3495,38	7144,41	1376,73	5571,95	1307,29
cellobiosa	16850,11	4466,83	24375,28	1896,53	12987,52	4496,50	6872,47	1699,40	5745,94	2024,69
phospho-celulosa	1888,96	1069,48	6946,18	2786,44	6142,14	2722,98	5196,54	1911,53	4721,17	1763,53
mc-celulosa	789,63	1124,06	18779,07	3470,94	8782,91	5002,76	6808,03	1774,77	7206,04	1133,56
xylosa	11733,31	3792,29	9071,74	3310,48	12695,43	5201,58	5547,09	2376,41	7305,98	1706,41
hemicelulosa	8500,08	3718,89	4467,43	2223,66	5271,35	1399,97	5929,80	1635,42	5673,84	1418,75
celulosa	2656,36	1342,51	4774,41	1620,62	6212,50	3687,21	6699,07	1173,19	2624,87	740,05
cm-celulosa	4483,06	1132,59	10293,52	3807,39	8593,81	5387,40	5062,33	1335,68	4610,64	1744,00
cm-xylan	10351,96	4675,74	15839,49	3411,74	10234,75	5973,64	6833,23	2339,73	7307,95	2476,23
škrob	3661,48	1240,72	16158,29	2378,28	4066,79	1787,76	7172,18	1102,01	7838,24	1749,56
laktosa	872,39	1007,03	11667,10	3318,80	6858,27	2691,35	7790,51	2424,63	3072,22	2016,90
arabinosa	1122,00	595,93	1407,94	1695,38	5256,35	3220,42	5158,94	1674,83	5213,10	1538,83
xylan	14497,74	6973,22	18118,41	3519,45	11688,78	8030,51	8613,58	1920,76	8267,27	2805,41

Tab. 13 Aktivita xylosidasy v závislosti na zdroji uhlíku v médiu u různých rodů hub

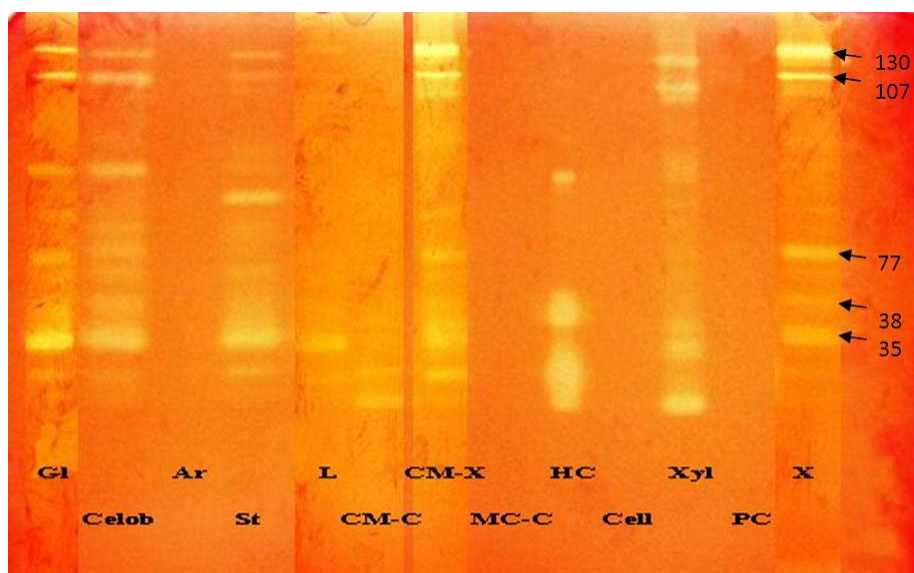
Srovnání specifických aktivit xylosidasy (pkat/mg proteinu)										
	<i>Anaeromyces</i> - KF8		<i>Orpinomyces</i> - KF7		<i>Caecomyces</i> - OF1		<i>Neocallimastix</i> - OF2		Neznámá -KF9	
	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární	intracelulární
glukosa	343,18	6442,25	550,08	6077,20	2036,04	2284,78	1506,15	2343,20	2730,43	1062,27
cellobiosa	519,91	6193,62	1836,05	4446,60	2772,53	2399,79	1107,78	1780,60	3267,28	1748,56
phospho-celulosa	82,83	410,64	25,49	1815,75	340,14	331,50	105,85	390,31	229,25	667,99
mc-celulosa	24,89	186,97	355,53	5252,43	431,37	285,47	187,73	1359,79	605,09	1769,41
xylosa	609,94	5832,09	334,96	5239,26	2236,46	1702,85	378,33	3349,38	7745,02	2730,95
hemicelulosa	499,54	7362,83	344,77	4039,43	912,96	904,49	2356,18	3274,66	5143,71	2895,41
celulosa	64,52	266,40	23,85	1586,34	348,41	266,06	952,69	2110,48	242,31	172,21
cm-celulosa	30,89	261,79	84,85	2296,33	443,96	351,22	104,66	313,99	267,58	577,63
cm-xylan	484,73	4236,98	784,31	5813,07	914,66	1593,50	996,44	4116,06	3578,85	2131,77
škrob	188,87	2569,15	577,48	4322,69	99,95	118,35	1085,09	1851,25	2356,57	1936,06
laktosa	46,09	312,31	488,59	4094,65	321,81	288,95	345,10	2454,31	457,32	1166,40
arabinosa	77,69	370,49	38,34	2600,32	643,81	637,64	210,15	347,83	477,00	746,19
xylan	892,28	12146,74	626,72	6557,81	2329,42	2938,24	3037,87	3668,59	6413,14	4093,58

Nejvyšší aktivity β -xylosidasy (tab. 13) byly naměřeny v intracelulární frakci a u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces*, kde aktivita dosahovala až 10x vyšších hodnot než v extracelulární frakci. β -xylosidasa byla u houby *Anaeromyces* inhibována mc-celulosou, cm-celulosou a laktosou, naopak indukována byla xylanem a hemicelulosou. U houby rodu *Orpinomyces* byla extracelulární β -xylosidasa indukována cellobiosou a inhibována celulosou a phospho-celulosou, stejně jako intracelulární β -xylosidasa. Intracelulární β -xylosidasa byla indukována xylanem a glukosou. Menší rozdíly mezi frakcemi byly zaznamenány u rodu *Neocallimastix* OF2. U této houby byla β -xylosidasa v obou frakcích inhibována phospho-celulosou a cm-celulosou a indukována v intracelulární frakci cm-xylanem a v extracelulární frakci xylanem. Zcela jinak se však chovala houba rodu *Caecomyces* OF1. Tato houba měla srovnatelné aktivity β -xylosidasy v obou frakcích, na cellobiose, celulose a xylose byly extracelulární aktivity vyšší než intracelulární. Na xylanu však byla naopak vyšší aktivita naměřena v intracelulární frakci.

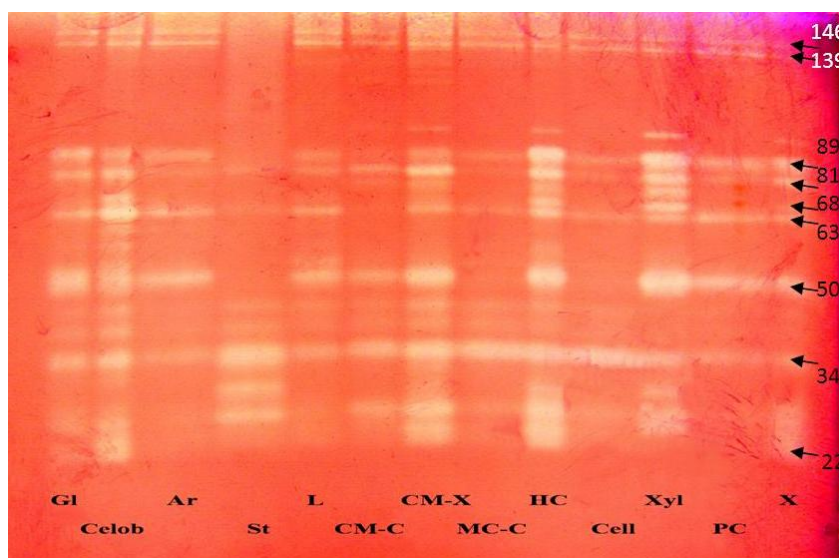
Endoxylanasa u všech studovaných kmenů měla jednoznačně vyšší aktivity v extracelulární frakci (tab. 12). Různé substráty však měly odlišný vliv na aktivity xylanas. U kmene *Orpinomyces* KF7 byla indukovaná celulosou a škrobem, naopak inhibována arabinosou. U kmene *Anaeromyces* KF8 byla endoxylanasa indukována hemicelulosou, cellobiosou a xylosou, naopak inhibována arabinosou a mc-celulosou. U kmene *Caecomyces* OF1 byla endoxylanasa indukována celobiosou a xylosou, inhibována celulosou. U kmene *Neocallimastix* OF2 byla indukována celulosou, hemicelulosou, glukosou a celobiosou a inhibována arabinosou a cm-celulosou. Jako nejvhodnější zdroj uhlíku v médiu se ukázal být xylan, při kterém oba enzymy dosahovaly nejvyšších aktivit.



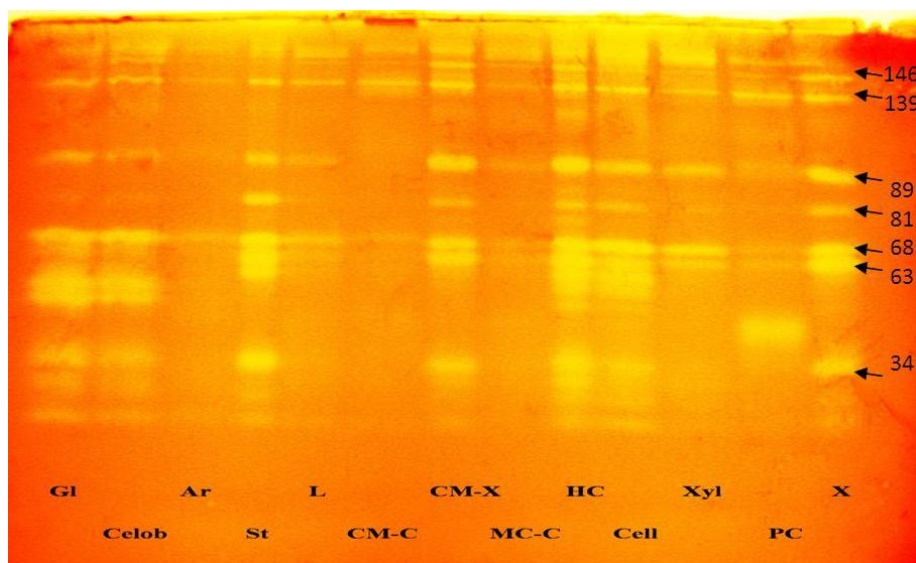
Obr. 15 Zymogram xylanas anaerobní houby rodu *Orpinomyces* KF7 při růstu na různých zdrojích uhlíku (Gl - glukosa, Celob - cellobiosa, Ar - arabinosa, St - škrob, L-laktosa, CM-C - CM-celulosa, CM-X - CM-xylan, MC-C – MC- celulosa, HC - hemicelulosa, Cell – celulosa, Xyl – xylosa, PC - phospho-celulosa, X – xylan).



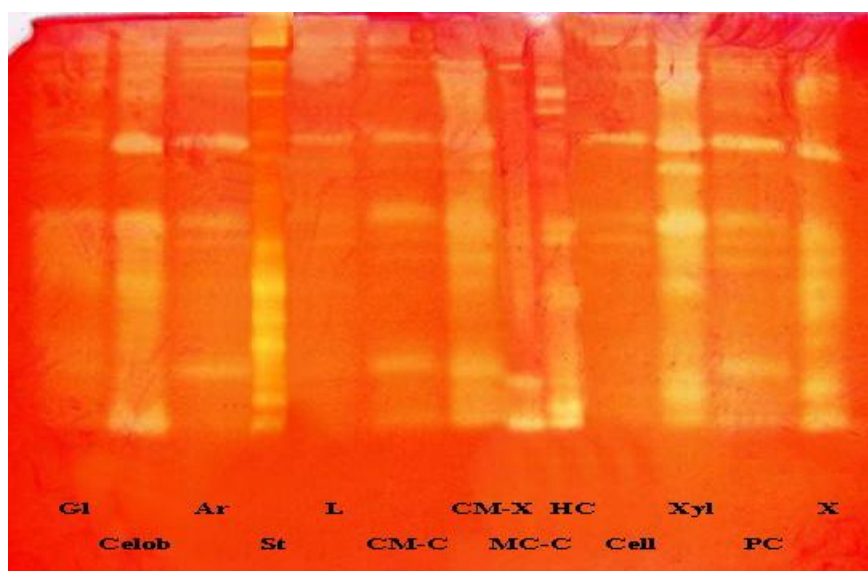
Obr. 16 Zymogram xylanas anaerobní houby rodu *Anaeromyces* KF8 při růstu na různých zdrojích uhlíku (Gl - glukosa, Celob - cellobiosa, Ar - arabinosa, St - škrob, L-laktosa, CM-C - CM-celulosa, CM-X - CM-xylan, MC-C – MC- celulosa, HC - hemicelulosa, Cell – celulosa, Xyl – xylosa, PC - phospho-celulosa, X – xylan).



Obr. 17 Zymogram xylanas anaerobní houby rodu *Caecomyces* OF1 při růstu na různých zdrojích uhlíku (Gl - glukosa, Celob - cellobiosa, Ar - arabinosa, St - škrob, L-laktosa, CM-C - CM-celulosa, CM-X - CM-xylan, MC-C – MC- celulosa, HC - hemicelulosa, Cell – celulosa, Xyl – xylosa, PC - phospho-celulosa, X – xylan).



Obr. 18 Zymogram xylanas anaerobní houby rodu *Neocallimastix* OF2 při růstu na různých zdrojích uhlíku (Gl - glukosa, Celob - cellobiosa, Ar - arabinosa, St - škrob, L-laktosa, CM-C - CM-celulosa, CM-X - CM-xylan, MC-C – MC- celulosa, HC - hemicelulosa, Cell – celulosa, Xyl – xylosa, PC - phospho-celulosa, X – xylan).



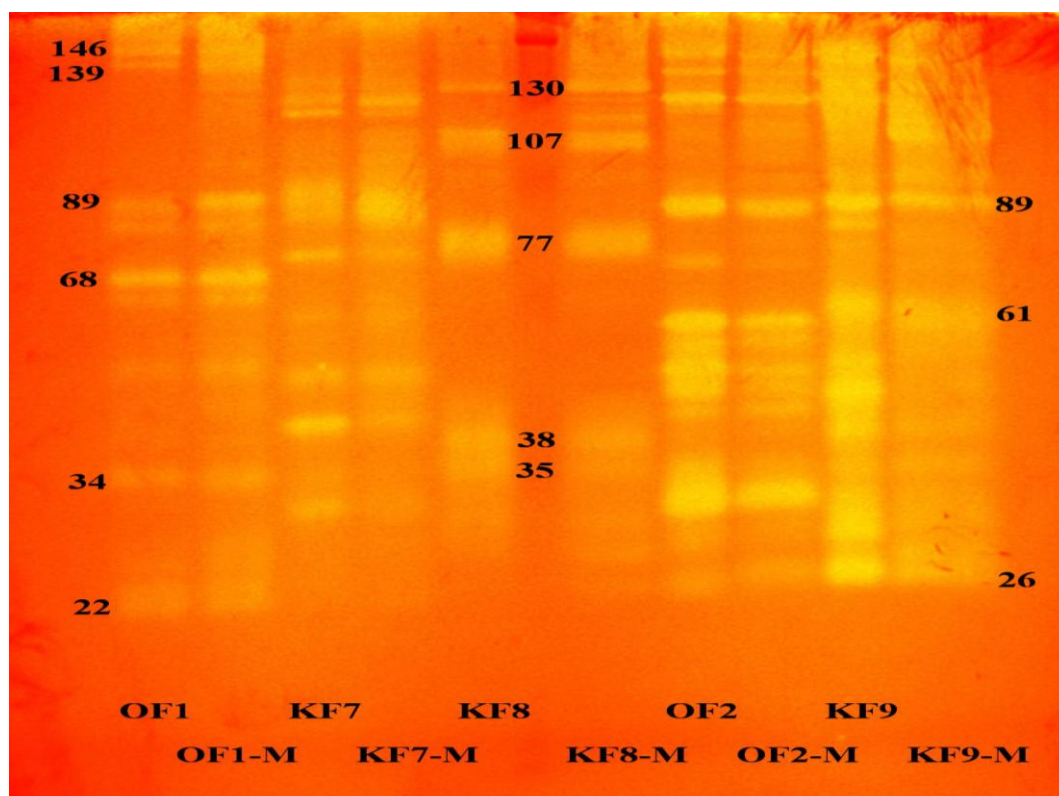
Obr. 19 Zymogram xylanasy neznámého izolátu KF9 při růstu na různých zdrojích uhlíku (Gl - glukosa, Celob - cellobiosa, Ar - arabinosa, St - škrob, L-laktosa, CM-C - CM-celulosa, CM-X - CM-xylan, MC-C – MC- celulosa, HC - hemicelulosa, Cell – celulosa, Xyl – xylosa, PC - phospho-celulosa, X – xylan).

Ze zymogramů na první pohled vyplývá, že exprese jednotlivých isoformů endoxylanasy je závislá na použitém zdroji uhlíku v médiu. U kmene *Orpinomyces* KF7 byly největší rozdíly zaznamenány v isoformách o molekulové hmotnosti mezi 30 až 60 kDa. Isoforma endoxylanasy o molekulové hmotnosti 49 kDa je aktivní u všech zdrojů uhlíku. Endoxylanasa u kmene *Anaeromyces* KF8 měla nejméně aktivních isoformů endoxylanasy. Největší rozdíly jsou u isoformů o molekulové hmotnosti pod 35 kDa, isoforma o molekulové hmotnosti 35 kDa není závislá na zdroji uhlíku a je přítomna u všech studovaných substrátů. U kmene *Caecomyces* OF1 je hlavní isoforma o molekulové hmotnosti 34 a 50 kDa a největší rozdíly jsou v isoformách o molekulové hmotnosti mezi 22 a 34 kDa a mezi 60 a 89 kDa. Hlavní isoformy endoxylanasy kmene *Neocallimastix* OF2 mají molekulovou hmotnost 68 a 89 kDa a největší rozdíly jsou v isoformách o molekulové hmotnosti mezi 34 a 63 kDa. Isoformy xylanasy pak byla detailněji studována při kultivaci anaerobních hub na xylanu jako zdroji uhlíku.

4.4.3 Isoformy endoxylanasy a xylosidasy při kultivaci hub na xylanu jako zdroji uhlíku

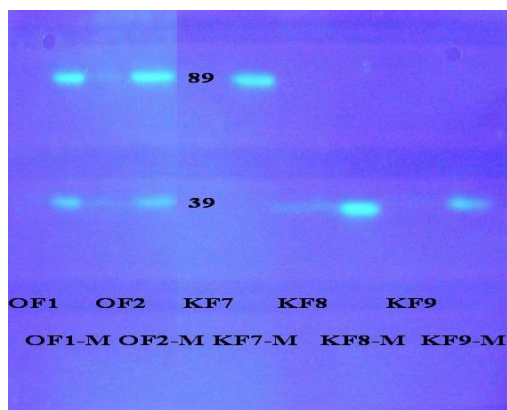
Houby rodů *Anaeromyces* KF8, *Orpinomyces* KF7, *Caecomyces* OF1, *Neocallimastix* OF2 a neznámá houba KF9 byly kultivovány při 39°C v médiu M10. Jako zdroj uhlíku v médiu byl použit xylan (4g/l). Isoformy endoxylanasy v médiu (OF1, KF7, KF8, OF2 a KF9) a intracelulární frakci (OF1-M, KF7-M, KF8-M, OF2-M, KF9-M) byly studovány pomocí SDS-elektroforézy s CM-xylanem zakomponovaným do gelu. Obr. 20 srovnává molekulové hmotnosti isoform endoxylanasy u rodů *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix* a neznámé houby KF9.

Nejméně aktivních isoform endoxylanasy je u houby rodu *Anaeromyces* a nejvíce isoform má endoxylanasa u neznámé houby KF9. Jak nejvyšší molekulové hmotnosti 146 kDa, tak i nejmenší molekulové hmotnosti 22 kDa dosahovala isoforma endoxylanasy u houby rodu *Caecomyces*.



Obr. 20 Zymogram isoform endoxylanasy s určenými molekulovými hmotnostmi u 5 kmenů anaerobních hub kultivovaných na xylanu jako zdroji energie.

Obr. 21 ukazuje isoformy xylosidasy u různých rodů hub. Prokázaly se 2 aktivní isoformy xylosidasy o velikosti 89 a 39 kDa u rodu *Caecomyces*, *Neocallimastix* a *Orpinomyces*. U rodu *Anaeromyces* a nové houby KF9 byla detekována pouze 1 aktivní forma o velikosti 39 kDa.



Obr. 21 Zymogram isoform xylosidasy s určenými molekulovými hmotnostmi u 5 kmenů anaerobních hub kultivovaných na xylanu jako zdroji energie.

4.4.4 Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na buněčné frakci

Anaerobní houby *Anaeromyces* KF8, *Orpinomyces* KF7, *Caecomyces* OF1 a neurčený druh KF9 byly kultivovány v 100 ml lahvích při 39°C v médiu M10. Jako zdroj uhlíku v médiu byl použit xylan (4g/l). Kultura byla zcentrifugována při 5000 RPM po dobu 20 min. při 4°C. Supernatant byl nazván extracelulární frakcí. Mycelium (3 g) bylo resuspendováno v 20 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6) s 0,25 M sacharosou a homogenizováno 5 min. na ledě (amplituda 60, puls 1s). Homogenát byl centrifugován při 4250 RPM 10 min. při 4°C. Pelet byl nazván frakce buněčných stěn. Homogenát byl centrifugován při 7500 RPM 10 min. při 4°C a pelet byl nazván hydrogenosomální frakcí. Supernatant byl centrifugován při 24000 RPM 60 min. při 4°C. Pelet byl nazván mikrosomální frakcí a supernatant cytosolovou frakcí. Mikrosomální frakce byla resuspendována v 100 mM fosfátovém pufru (pH 6) pro stanovení enzymů.

Aktivita enzymů byla stanovována ve všech výše popsáných intracelulárních a extracelulární frakci. Tab. 14 srovnává hodnoty naměřené pro jednotlivé frakce.

Tab. 14 Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na buněčné frakci u jednotlivých rodů hub

Aktivita endoxylanasy a xylosidasy (pkat/mg) v závislosti na buněčné frakci				
frakce	KF8 <i>Anaeromyces</i>		KF9	
	endoxylanasa	xylosidasa	endoxylanasa	xylosidasa
médium	14497,74	892,28	8267,27	6413,14
frakce buněčných stěn	1165,42	1009,25	2615,16	1355,19
hydrogenosomální frakce	2791,26	1000,78	1406,03	911,31
lysozomální frakce	1527,95	496,71	968,98	525,27
mikrosomální frakce	1223,01	648,28	1197,79	911,32
cytosol	4949,12	10134,75	6864,35	17128,74
frakce	KF7 <i>Orpinomyces</i>		OF1 <i>Caecomyces</i>	
	endoxylanasa	xylosidasa	endoxylanasa	xylosidasa
médium	18118,41	935,81	11688,78	2329,42
frakce buněčných stěn	4740,30	1641,26	3380,94	6511,50
hydrogenosomální frakce	1304,55	402,12	2742,96	1504,89
lysozomální frakce	1064,54	210,03	2562,12	1213,00
mikrosomální frakce	1270,75	607,30	3977,14	2614,69
cytosol	4117,82	9658,25	10305,34	18898,44

Endoxylanasa dosahovala nejvyšších hodnot u všech hub v extracelulární frakci (v médiu), což je v souladu se všemi předešlými výsledky. Naopak xylosidasa je produkována intracelulárně a výrazně vyšší aktivity byly naměřeny vždy v cytosolové frakci. Nejnižších hodnot dosahovaly oba enzymy v lysozomální frakci.

4.4.5 Xylanolytický komplex

Anaerobní houby *Anaeromyces* KF8, *Orpinomyces* KF7, *Caecomyces* OF1, *Neocallimastix* OF2 a neurčený druh KF9 byly kultivovány 4 dny při 39°C v médiu M10. Jako zdroj uhlíku v médiu byl použit xylan (4g/l). Poté byla v extracelulární a intracelulární frakci stanovena velká řada enzymů, které se podílejí na rozkladu xylanu, a to jak hlavního řetězce, tak

i bočních větvích řetězců. Aktivity jednotlivých enzymů xylanolytického komplexu ukazuje tab. 15.

Tab. 15 Aktivita enzymů celého xylanolytického komplexu u jednotlivých rodů anaerobních hub

Aktivita enzymů xylanolytického komplexu (pkat/mg)				
	<i>Anaeromyces</i> KF8		<i>Caecomyces</i> OF1	
	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární
endo-1,4- β -xylanasa	319,27	471,75	1070,02	1256,64
β -xylosidasa	715,07	295,99	30007,00	988,42
α -xylosidasa	2,78	0,23	35,66	2,00
acetylxylan esterasa	764,54	13,41	297,82	243,89
arabinasa [exo- α -L-arabinofuranosidasa]	18,79	14,44	606,69	82,75
esterasa kyseliny ferulové	nd	nd	nd	nd
esterasa kyseliny kumarové	nd	nd	nd	nd
α -glukuronidasa	175,72	259	318,91	328,32
	<i>Orpinomyces</i> KF7		<i>Neocallimastix</i> OF2	
	intracelulární	extracelulární	intracelulární	extracelulární
endo-1,4- β -xylanasa	852,85	354,22	1268,37	1188,26
β -xylosidasa	11778,82	350,17	33741,78	2316,96
α -xylosidasa	12,74	0,49	17,16	13,52
acetylxylan esterasa	1534,09	200,24	633,64	324,00
arabinasa [exo- α -L-arabinofuranosidasa]	55,14	35,95	335,23	298,10
esterasa kyseliny ferulové	nd	nd	nd	nd
esterasa kyseliny kumarové	nd	nd	nd	nd
α -glukuronidasa	1001,16	258,51	581,75	186,86
	KF9			
	intracelulární	extracelulární		
endo-1,4- β -xylanasa	2519,81	1497,77		
β -xylosidasa	18917,67	3395,72		
α -xylosidasa	62,28	4,16		
acetylxylan esterasa	131,20	83,51		
arabinasa [exo- α -L-arabinofuranosidasa]	241,91	202,49		
esterasa kyseliny ferulové	nd	nd		
esterasa kyseliny kumarové	nd	nd		
α -glukuronidasa	934,29	754,67		

Nejaktivnější enzymy celého xylanolytického systému se ukázaly být endoxylanasa a xylosidasa, které u všech hub dosahovaly nejvyšších aktivit. Opět bylo potvrzeno, že endoxylanasa je nejaktivnější v extracelulární frakci nebo xylosidasa v intracelulární frakci. Naopak nedetekovatelnými enzymy, alespoň pomocí námi použité metody, se ukázaly být esterasa kyseliny ferulové a esterasa kyseliny kumarové. Enzym α -xylosidasa nepatří do xylanolytického systému, do srovnání byl zařazen jen z důvodu prokázání stereospecifity enzymů. Proto také dosahuje tak malých hodnot.

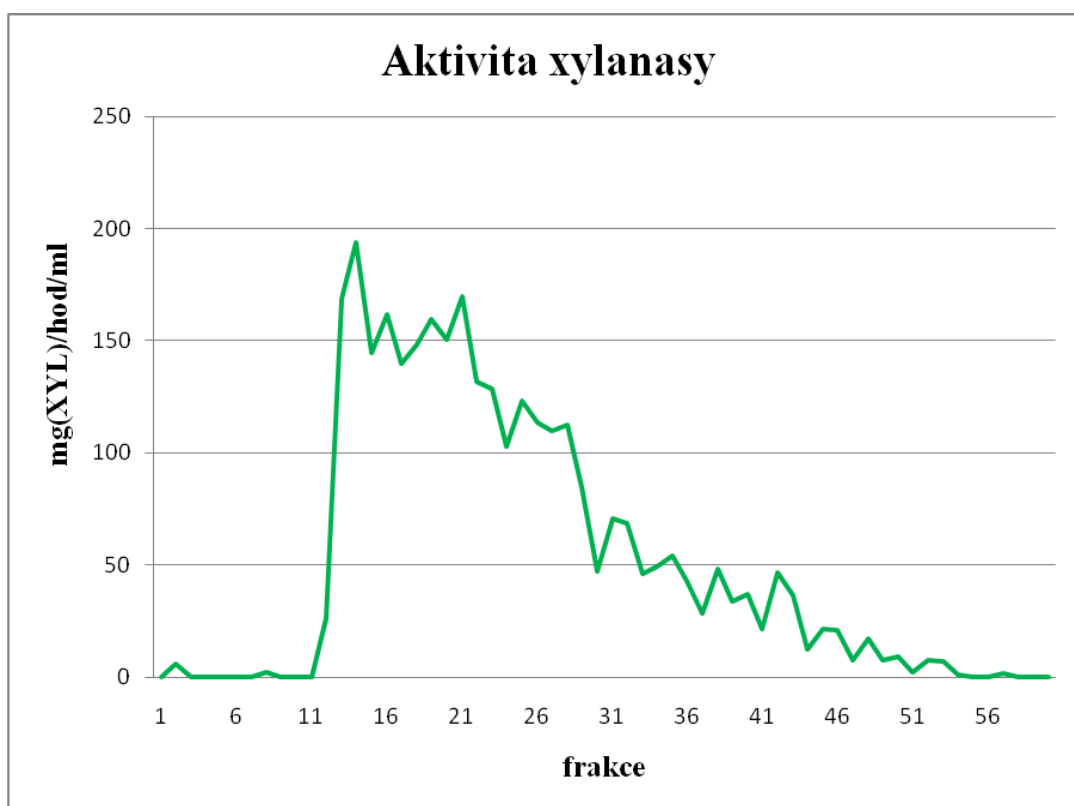
4.4.6 Frakcionace endoxylanasy pomocí SEPHADEXU G-100 a sekvenace MALDI-TOF

Houba rodu *Anaeromyces* KF8 byla kultivována 4 dny při 39°C v médiu M2 s xylanem jako zdrojem uhlíku (4g/l). Poté bylo médium centrifugováno (15 000 RPM/5°C/45 min.) a 28x zahuštěno. Na připravenou kolonu SEPHADEXU G-100 promývanou fosfátovým pufrům pH 6 bylo nanášeno 0,5 ml zahuštěného média a frakce procházející kolonou byly sbírány po 1 nebo 5 ml. Obr. 22 a 23 ukazují graf frakcionace endoxylanasy a xylosidasy na SEPHADEXU G-100 (frakce 1 ml).

Dělení na SEPHADEXU neukázalo žádnou možnost dělení endoxylanasy. Všechny frakce vykazovaly enzymovou aktivitu. U endoxylanasy se prokázala přítomnost mnoha izoform, zatímco u xylosidasy přítomnost pouze jednoho enzymu.

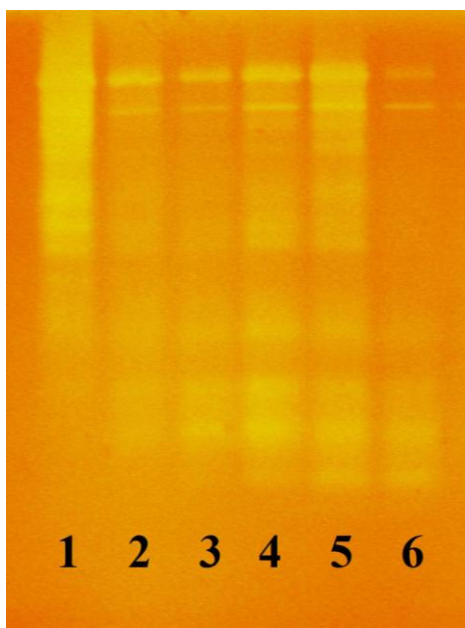


Obr. 22 Frakcionace xylosidasy při dělení na SEPHADEXU G-100 (frakce 1 ml)



Obr. 23 Frakcionace xylanasy při dělení na SEPHADEXU G-100 (frakce 1 ml)

Ani opětovné smíchání a zakoncentrování nejaktivnějších frakcí (obr. 24) nevedla k omezení počtu izoform a k rozdělení endoxylanasy.



Obr. 24 Zymogram xylanasy zakoncentrovaných frakcí po dělení na sephadexové koloně. 1-frakce 12-16, 2-frakce 17-19, 3-frakce 20-21, 4-frakce 22-23, 5-frakce 24-26, 6-frakce 27-28

Protože se nevedlo endoxylanasu a xylosidasu rozdělit do čistých frakcí, pro analýzu MALDI-TOF, která byla provedena ve spolupráci s Laboratoří charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu AV ČR, byly použity aktivní fragmenty zymogramu. Ze zymogramu byly vyříznuty bandy o velikosti 107 a 77 kDa (endoxylanasa) a 39 kDa (xylosidas). I přes několikeré opakování se nepovedlo osekvenovat xylosidasu a u endoxylanasy jsme získali pouze 2 krátké úseky peptidů, jejichž sekvence neodpovídala údajům enzymů uvedeným v dostupných databázích: **DFQVEDDNV** a **MHPGLGS**.

4.4.7 Fylogenetická analýza endoxylanasy houby KF8

Z houby rodu *Anaeromyces* KF8 byla izolována genomická DNA a byly amplifikovány úseky pro xylanasu A. Amplifikované úseky byly naklonovány do plasmidu a osekvenovány. Dále byly do této analýzy zařazeny i další anaerobní houby uložené ve sbírce mikroorganismů ÚŽFG AV ČR, a to kmeny *Anaeromyces* Zu2 a JF1 izolované z trusu bisona a jelena a kmeny *Orpinomyces* Zu1, KF1, KF2, KF3, KF5, KF6 izolované z trusu bisona a krávy.

Gen pro Xyn A houby rodu *Anaeromyces* KF8 byl osekvenován s následující sekvencí:

GGAGGCGGTGGTGCCTCTGCTGGTACAAAATTATCCGTTGGTGGTGGTCAAAACCAACATAAGGGT
GTTTCCGATGGTTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAAACTGGTGGTAGCGGTTCTATGACTCTCG
GTAAGGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAATGCTGCTGTTAACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTC
GTGGTCTTGACTTCGGTTCCTCCAAAAAGGCAACTGCTTACGATTACATTGGTATGGATTATGAAGC
ATCTTACAGACAACTGCCAGTGCAAGTGGTAACTCCCGTCTTTGTGTATACGGCTGGTTCAAAA
CCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTAGTAGAATACTACATTATTGAAGATTGGGTTGACTGGGTACC
AGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATTGACGGTGCTCAATATAAGATTTTCCAAATGGATCACAC
TGGTCCAACATATCAATGGTGGTAGTGAAACCTTTAAGCAATACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAG
AACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCATGGGCCAATCAAGGTTGGGGTATTGG
AAACCTCTATGAAGTTGCATTAAACGCTGAAGGTTGGCAAAGTAGTGGTGTAGCTGACGTCACTAA
GTTAGATGTTTACACCACCAAAACCAGGTTCTGTTGCTACTACTACCACTCGTCCAACCACCACTCGT
ACAACCACCACTCGTACTTCTAACAGTACAAAACTCTCCAGTTACTAACAAGTGTCTGCCAAG
ATTGTTGCTCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGTGTTGTTTACTACACTGATAACGATG
GTACTTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGTTGTGGTCTTGGAGAATCATGTTCTTCCAAGA
TTCTTTCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGTGTTGTTTACTACACTGATAACGATGG
TAAATGGGGT

Gen pro Xyn A houby rodu *Anaeromyces* JF1 byl osekvenován s následující sekvencí:

TGGGGAGGCGGTGGTGCCTCTGCTGGTACAAAATTATCCGTTGGTGGTGGTCAAAACCAACATAAG
GGTGTTCGATGGTTTCAGTTATAAAATCTGGTTAGATAAACTGGTGGTAGTGGTTCTATGACTC
TCGGTAAGGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCTGCTGTTAACCGTGGTAACTTCCTTGCCC
GTCGTGGTCTTGACTTCGGTTCCTCCAAAAAGGCAACTGCTTACGATTACATTGGTATGGATTATGA
AGCATCTTACAGACAACTGCCAGTGCAAGTGGTAACTCCCGTCTTTGTGTATACGGCTGGTTC
AAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTAGTAGAATACTACATTATTGAAGATTGGGTTGACTGGGT
ACCAKATGCACAAGGAAAAATGGTAACTATTGACGGTGCTCAATATAAGATTTTCCAAATGGATCA
CACTGGTCCAACATATCAATGGTGGTAGTGAAACCTTTAAGCAATACTTCAGTGTCCGTCAACAAAA
GAGAACTTCTGGTCAATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCATGGGCCAATCAAGGTTGGGGTAT
TGAAAACCTCTATGAAGTTGCATTAAACGCTGAAGGTTGGCAAAGTAGTGGTGTAGCTGACGTAC
TAAGTTAGATGTTTACACCACCAAAACCAGGTTCTGTTGCTACTACTACCACTCGTCCAACCACCACT
CGTACAACCACCACTCGTACTTCTAACAGTACAAAACTCTCCAGTCACTAACAAGTGTCTGCC
AAGATTGTTGCTCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGTGTTGTTTACTACACTGATAACG
ATGGTACTTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGTTGTGGTCTTGGAGAATCATGTTCTTCCA
AGATTCTTTCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGTGTTGTTTACTACCA

Gen pro Xyn A houby rodu *Anaeromyces* Zu2 byl osekvenován s následující sekvencí:

NCCGTTGCTAAGGCCAATGGGGAGGCGGTGGTGCCTCTGCTGGTACAAAATTATCCGTTGGTGGT
GGTCAAAACCAACATAAGGGTGTTCGATGGTTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAAACTGGT
GGTAGCGGTTCTATGACTCTCGGTAAGGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAATGCTGCTGTTAAC
CGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGACTTCGGTTCCTCCAAAAAGGCAACTGCTTACGATT
ACATTGGTATGGATTATGAAGCATCTTACAGACAACTGCCAGTGCAAGTGGTAACTCCCGTCTTT
GTGTATACGGCTGGTTCAAAAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTAGTAGAATACTACATTATTG
AAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATTGACGGTGCTCAATAT
AAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACATCAATGGTGGTAGTGAAACCTTTAAGCAATAC
TTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCATGG
GCCAATCAAGGTTGGGGTATTGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTAAACGCTGAAGGTTGGCAAAGT
AGTGGTGTAGCTGAYGTCACCTAAGTTAGATGTTTACACCACCAAAACCAGGTTCTGTTGCTACTACT
ACCCTCGTCCAACCACCACTCGTACAACCACCACTYGTACTTCTAACAGTACAAAACTCTCCCA
GTCACCTAACAAGTGTCTGCCAAGATTGTTGCTCAAGGTYACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGT
GTTGTTTACTACACTGATAACGATGGTACTTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGTTGTGGT
CTTGGAGAATCATGTTCTTCCAWRATTCTTTCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAACTGTG
TTGTTTACTACACTGATAACGATGGTAAATGG

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* Zu1 byl osekvenován s následující sekvencí:

NAACCGTTGCTAGGCCCATGGGGTGGAANCGGTGGTGCCTCTGCTGGTCAAAGATTAAGCGTTGGT
GGTGGTCAAAACCAACATAAAGGTGTTTTGATGGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAACACC
GGTGGTAGTGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCAGCTGTT
AACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGATTTGCGTTCTACCAAAAAGGCAACCGCTTACG
AATACATCGGATTGGATTATGAAGCAAGTTACAGACAAACTGCCAGCGCAAGTGGTAACTCCCGTC
TTTGTGTATACGGCTGGTTCCAAAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTACATCAT
TGAAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTGCACAAT
ATAAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACCTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTTAAGCAAT
ACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCAT
GGGCCAATCAAGGTTGGGGTATTGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGTTGGCAA
AGTAGTGGTGTGCTGACGTACCAAGTTGGATGTCTACACCACCAACAAGGTTCTGCTCCTCGT
ACTACCACCACCACTACCCGTACTACTACCCGTACTACTACAAAACACTTCCAACCAATAGTAAA
AAATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAATTGTGTTGTTTACT
ACACTGATGAAGATGGTACCTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGATGTGGTGTGTAAGCAT
GTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGGTAGTGATCCAAAGTGTGTTGTTTACTACAC
TGATGACGATGGTAAATGGTT

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* KF1 byl osekvenován s následující sekvencí:

NNGGCCGTTGGGTCAAAAGGATTAAGCGTTGGTGGTGGTCAAAACCAACATAAAGGTGTTTTGAT
GGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAACACCGGTGGTAGTGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGT
GCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCAGCTGTAAACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTG
ATTTGCGTTCTACCAAAAAGGCAACCGCTTACGAATACATCGGATTGGATTATGAAGCAAGTTACA
GACAACTGCCAGTGAAGTGGTAACTCCCGTCTTTGTGTATACGGCTGGTTCCAAAACCGTGGAG
TTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTACATCATTGAAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCAC
AAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTGCACAATATAAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAA
CTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTCAAGCAATACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTG
GTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCATGGGCCAATCAAGGTTGGGGTATTGGAAACCTCT
ATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGTTGGCAAAGTAGTGGTGTGCTGCTGACCTACCAAGTTGGATG
TCTACACCACCAACAAGGTTCTGCTCCTCGTACTACCACCACCACTACCCGTACTACTACCCGTAC
TACTACAAAACACTTCCAACCAATAATAATAATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAA
GTGTTGTAGTGATCCAAATTGTGTTATTTACTACACTGATGATGATGGTACCTGGGGTGTGAAAAC
AATCAATGGTGTGGATGTGGTGTGTTGATCATGTTCTGCCGAAGATTAAGTCCCC

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* KF2 byl osekvenován s následující sekvencí:

NNAGGCCAATGGGGTGGAANCGGTGGTGCCTCTGCTGGTCAAAGATTAAGCGTTGGTGGTGGTCA
AAACCAACATAAAGGTGTTTTGATGGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAACACCGGTGGTAG
TGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCAGCTGTAAACCGTGG
TAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGATTTGCGTTCTACCAAAAAGGCAACCGCTTACGAATACATS
GGATTGGATTATGAAGCAAGTTACAGACAAACTGCCAGCGCAAGTGGTAACTCCCGTCTTTGTGTA
TACGGCTGGTTCCAAAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTACATCATTGAAGAT
TGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTGCACAATATAAGAT
TTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACCTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTCAAGCAATACTTCAG
TGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCATGGGCCAA
TCAAGGTTGGGGTATAGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGTTGGCAAAGTAGTG
GTGTCGCTGACGTACCAAGTTGGATGTCTACACCACCAACAAGGTTCTGCTCCTCGTACTACCA
CCACCCTACCCGTACTACTACCCGTACTACTACAAAACACTTCCAACCAATGGTAATAAATGTT
CTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAATTGTGTTGTTTACTACACTGA
TGAAGATGGTACCTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGATGTGGTGTGTTGTTTACTACACTGA
CAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAAGTGTGTTGTTTACTACACTGATGG
CGATGGTAAATGG

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* KF3 byl osekvenován s následující sekvencí:

NNCCGTTTGCTAGGCCCATGGGGTGGAACGGTGGTGCCTCTGCTGGTCAAAGATTAAGCGTTGGT
GGTGGTCAAACCAACATAAAGGTGTTTTTGATGGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGATAACACC
GGTGGTAGTGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCAGCTGTT
AACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGATTTCCGGTTCTACCAAAAAGGCAACCGTTACG
AATACATCGGATTGGATTATGAAGCAAGTTACAGACAAACTGCCAGCGCAAGTGGTAACTCCCGTC
TTTGTGTATACGGCTGGTTCCAAAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTACATCAT
TGAAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTGCACAAT
ATAAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACCTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTCAAGCAAT
ACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTAAGGCAT
GGGCCAATCAAGGTTGGGGTATAGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGTTGGCAA
AGTAGTGGTGTGCTGACGTACCAAGTTGGATGTCTACACCACCAACAAGGTTCTGCTCCTCGT
ACTACCACCACCACTACCCGTACTACTACCCGTACTACTACAAAACACTTCCAACCAATGGTAAT
AAATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAATTGTGTTGTTTACT
TCACTGATGAAGATGGTACCTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGATGTGGTGTGTATCAT
GTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAAGTGTGTTGTTTACTACAC
TGATGGCGATGGTAAATGGG

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* KF5 byl osekvenován s následující sekvencí:

ATTACAACCGTTGCTAAGGCCCAATGGGGTGGAACGGTGGTGCCTCTGCTGGTCAAAGATTAAGC
GTTGGTGGTGGTCAAACCAACATAAAGGTGTTTTTGATGGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGAT
AACACCGGTGGTAGTGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCA
GCTGTTAACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGATTTCCGGTTCTACCAAAAAGGCAACCG
CTTACGAATACATCGGATTGGATTATGAAGCAAGTTACAGACAAACTGCCAGCGCAAGTGGTAACT
CCCGTCTTTGTGTATACGGCTGGTTCCAAAACCTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTA
CATCATTGAAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTG
CACAATATAAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACCTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTCA
AGCAATACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTA
AGGCATGGGCCAATCAAGGTTGGGGTATAGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGT
TGGCAAAGTAGTGGTGTGCTGACGTACCAAGTTGGATGTCTACACCACCAACAAGGTTCTGCT
CCTCGTACTACCACCACCACTACCCGTACTACTACCCGTACTACTACAAAACACTTCCAACCAAT
GGTAATAAATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAATTGTGTT
GTTTACTACACTGATGAAGATGGTACCTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGATGTGGTGT
GTATCATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAAGTGTGTTGTT
ACTACACTGATGGCGATGGTAAATGGGGTG

Gen pro Xyn A houby rodu *Orpinomyces* KF6 byl osekvenován s následující sekvencí:

NTTTAAACCGGTTGGCTAGGCCCATGGGGTGGAACGGTGGTGCCTCTGCTGGTCAAAGATTAAGC
GTTGGTGGTGGTCAAACCAACATAAAGGTGTTTTTGATGGCTTCAGTTATGAAATCTGGTTAGAT
AACACCGGTGGTAGTGGTTCCATGACCCTTGGTAAAGGTGCAACCTTCAAGGCTGAATGGAGTGCA
GCTGTTAACCGTGGTAACTTCCTTGCCCGTCGTGGTCTTGATTTCCGGTTCTACCAAAAAGGCAACCG
CTTACGAATACATCGGATTGGATTATGAAGCAAGTTACAGACAAACTGCCAGCGCAAGTGGTAACT
CCCGTCTTTGTGTATACGGCTGGTTCCAAAACCGTGGAGTTCAAGGCGTACCTTTGGTAGAATACTA
CATCATTGAAGATTGGGTTGACTGGGTACCAGATGCACAAGGAAAAATGGTAACCATCGATGGTG
CACAATATAAGATTTTCCAAATGGATCACACTGGTCCAACCTATCAATGGTGGTAATGAAACCTTCA
AGCAATACTTCAGTGTCCGTCAACAAAAGAGAACTTCTGGTCATATTACTGTATCAGATCACTTTA
AGGCATGGGCCAATCAAGGTTGGGGTATAGGAAACCTCTATGAAGTTGCATTGAACGCAGAAGGT
TGGCAAAGTAGTGGTGTGCTGACGTACCAAGTTGGATGTCTACACCACCAACAAGGTTCTGCT
CCTCGTACTACCACCACCACTACCCGTACTACTACCCGTACTACTACAAAACACTTCCAACCAAT
GGTAATAAATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAATTGTGTT
GTTTACTACACTGATGAAGATGGTACCTGGGGTGTGAAAACAATCAATGGTGTGGATGTGGTGT
GTATCATGTTCTGCCAAGATTACTGCCCAAGGTTACAAGTGTGTAGTGATCCAAAGTGTGTTGTT
ACTACACTGATGGCGATGGTAAATGGG

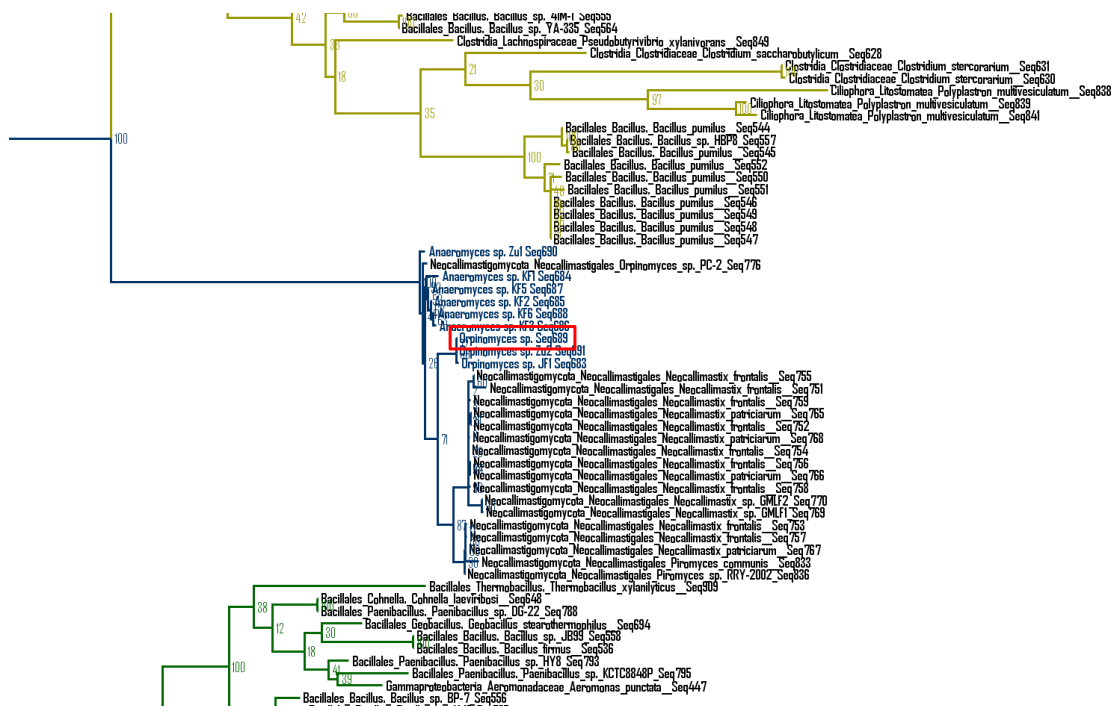
Námi vyprodukované sekvence byly porovnány se sekvencemi uvedenými v GenBank databázi. Na obr. 25 jsou uvedeny GenBank sekvence anaerobních hub. Společně s těmito daty bylo do fylogenetické analýzy zařazeno 194 xylanaseových sekvencí. Úplný fylogenetický strom je zobrazen na obr. 26, výřez zaměřený na sekvence anaerobních hub a nejbližší klastry je uveden na obr. 26a. Fylogenetická analýza xylanase rodiny 11 je zobrazena na obr. 27.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U57819.1	Orpinomyces sp. PC-2 xylanase (xynA) mRNA, complete cds	1304	1587	99%	0.0	91%
AY134029.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-12 gene, partial cds	1223	1223	99%	0.0	89%
AY133990.1	Neocallimastix patriciarum clone xynw1-A2 xylanase gene, partial cds	1218	1218	99%	0.0	88%
AY131337.1	Neocallimastix frontalis xylanase (xynsk1-2) gene, partial cds	1218	1218	99%	0.0	88%
AY134031.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-20 gene, partial cds	1212	1212	99%	0.0	88%
AY134028.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-11 gene, partial cds	1212	1212	99%	0.0	88%
AY133991.1	Neocallimastix patriciarum clone xynw1-11 xylanase gene, partial cds	1212	1212	99%	0.0	88%
AY133989.1	Neocallimastix patriciarum clone xynw1-A1 xylanase gene, partial cds	1206	1206	99%	0.0	88%
AY134030.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-18 gene, partial cds	1201	1201	99%	0.0	88%
AY133992.1	Neocallimastix patriciarum clone xynw1-4 xylanase gene, partial cds	1195	1195	99%	0.0	88%
AY134033.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-14 gene, partial cds	1192	1192	98%	0.0	88%
AY134032.1	Neocallimastix frontalis xylanase xynsk1-15 gene, partial cds	1190	1190	99%	0.0	88%
AY131336.1	Neocallimastix frontalis xylanase (xyn11B) gene, partial cds	1190	1190	99%	0.0	88%
AY941119.1	Uncultured Neocallimastigales xylanase R8 gene, partial cds	1131	1252	95%	0.0	91%
X65526.1	N.patriciarum mRNA for xylanase A	1114	2040	99%	0.0	91%
AY601669.1	Neocallimastix frontalis xylanase (xyn11A) mRNA, complete cds	1114	2040	99%	0.0	91%
EU314935.1	Piromyces communis endo-1,4-beta-xylanase (xynWF1) mRNA, comp	1112	1112	99%	0.0	87%
X82266.1	N.frontalis mRNA from endoxylanase	1109	2013	99%	0.0	90%
FJ586243.1	Neocallimastix sp. GMLF2 xylanase (xyn2A) gene, partial cds	998	998	67%	0.0	93%
EU909695.1	Neocallimastix sp. GMLF1 xylanase (xyn1B) gene, partial cds	992	992	67%	0.0	93%
AY130763.1	Piromyces sp. RRY-2002 xylanase gene, partial cds	974	974	66%	0.0	93%
GU011968.1	Orpinomyces sp. FCT 2 xylanase (xynA) mRNA, partial cds	713	713	44%	0.0	95%

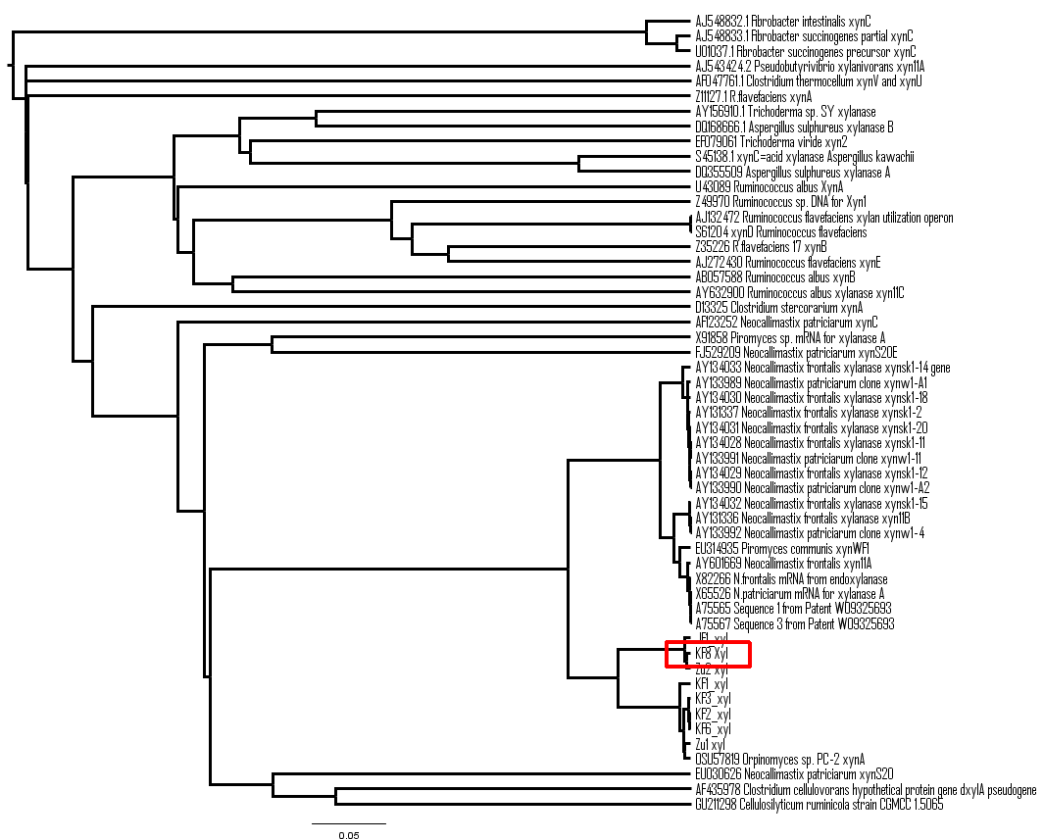
Obr. 25 Sekvence xylanase anaerobních hub publikované v GenBank databázi



Obr. 26 Fylogenetický strom bakteriálních a fungálních endoxylanas



Obr. 26a Část fylogenetického stromu endoxylanase se zaměřením na anaerobní houby



Obr. 27 Fylogenetická studie endoxylanasy anaerobních hub rodiny I1.

Z fylogenetické studie xylanasy rodu *Anaeromyces* (Zu2, KF8, JF1) a *Orpinomyces* (KF1, KF2, KF3, KF5, KF6, Zu1) vyplývá, že námi generované sekvence jsou podobné se sekvencemi rodu *Neocallimastix* a *Piromyces* sp. z GenBank databáze. Sekvence tak vytvářejí monofyletickou skupinu xylanasy anaerobních hub. Uvnitř této skupiny se však zvlášť seskupují xylanasy rodu *Anaeromyces* a xylanasy rodu *Orpinomyces*, což je zvlášť dobře patrné na obr. 27. Z obrázku 26 pak vyplývá, že xylanasy rodu *Anaeromyces* a *Orpinomyces* vytvářejí sesterskou skupinu ke xylynasám smíšené skupiny rodů *Neocallimastix* a *Piromyces*. Pozoruhodným výsledkem této analýzy je, že xylanasy anaerobních hub jsou více podobné bakteriálním xylanasám klostridií a bacilů, nežli fungálním xylanasám. Tento výsledek indikuje možný horizontální přenos genů mezi bachorovými bakteriemi a bachorovými houbami.

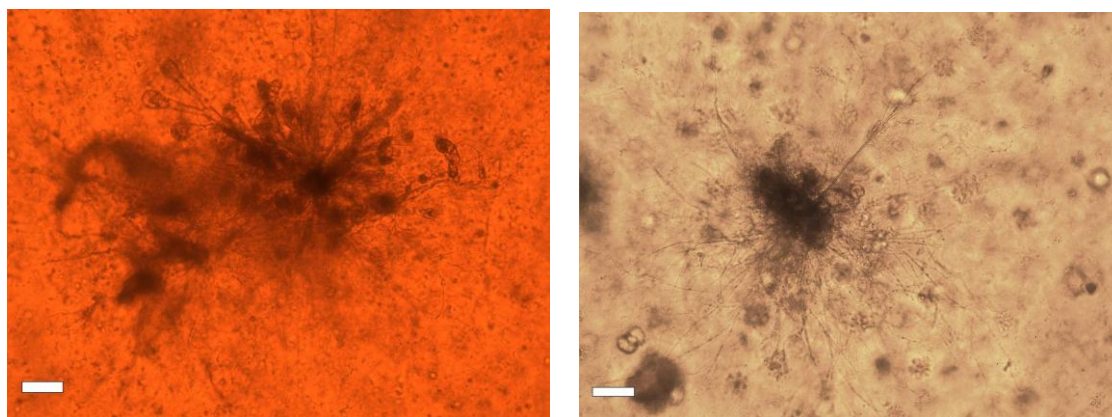
4.5 Popis nového izolátu KF9

4.5.1 Mikroskopické pozorování, morfologický popis

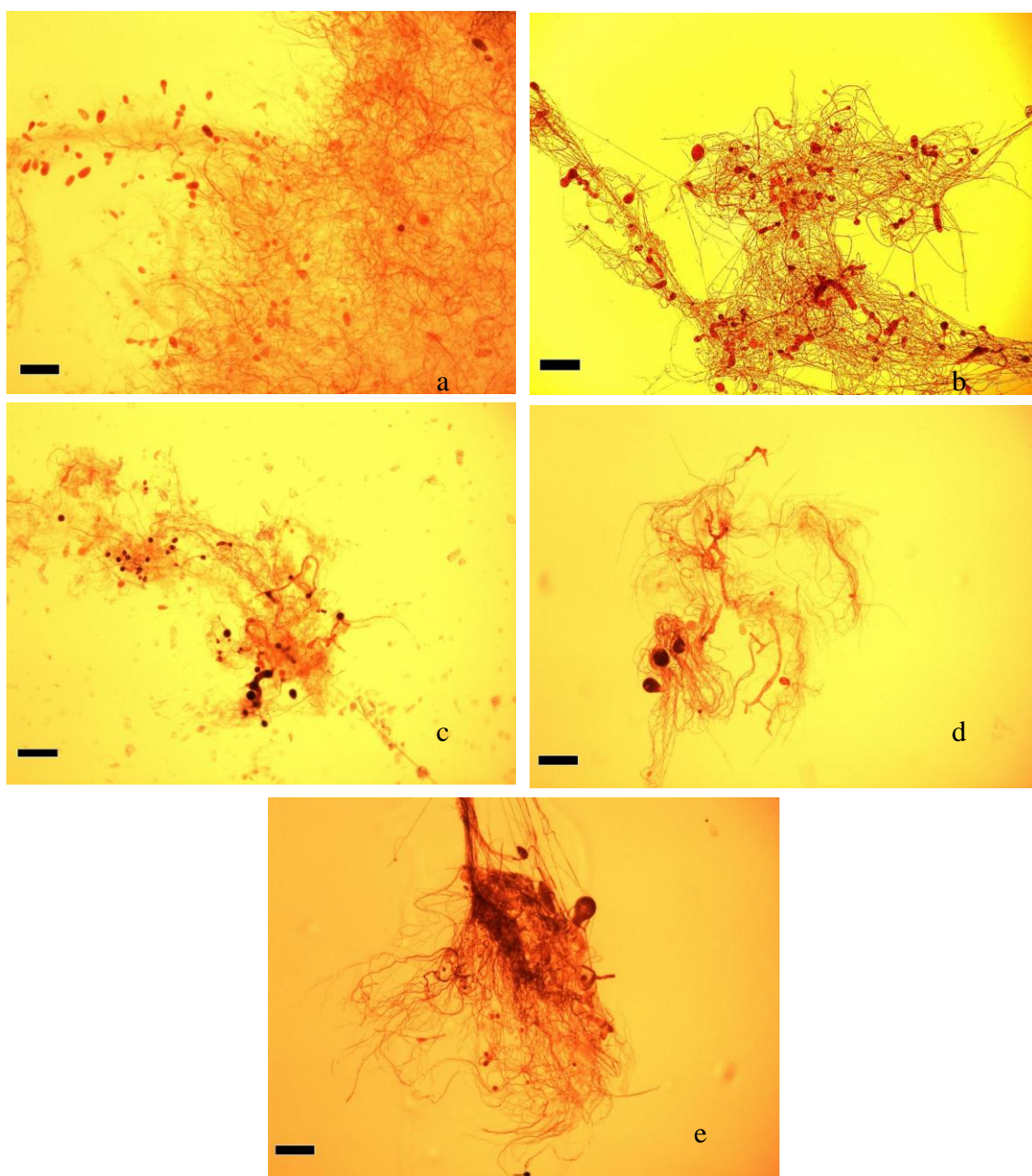
Houba KF9 byla izolována z bachorové tekutiny krávy a poté kultivována v médiu M10 s cellobiosou (4 g/l) jako zdrojem uhlíku. Pro detailnější popis a morfologické porovnání byla tato houba také kultivována na následujících substrátech (vše 4 g/l): glukosa, MC-celulosa, xylan a filtrační papír (obr. 29)

Stélka houby KF9 je monocentrická, sporangia mají rozličné tvary, od kulovitých (průměr 25 až 70 μm), rozdvojených až po podlouhlé (rozměr 20-25 x 50-100 μm). Sporangium roste na krátkém sporangiophoru, který se svou šířkou přizpůsobuje velikosti sporangia a je od něj odděleno basálním septem. Mycelium tvoří rozvětvené úzké hyfy se spoustou oddenků. Jednojaderné polyflagelární zoospory jsou elipsoidní až kulovité o průměru 7-12 μm se 3-12 bičíky (občas i 1 nebo 2) dlouhými 30-40 μm , které jsou umístěny posteriálně (obr. 30,31,32,33).

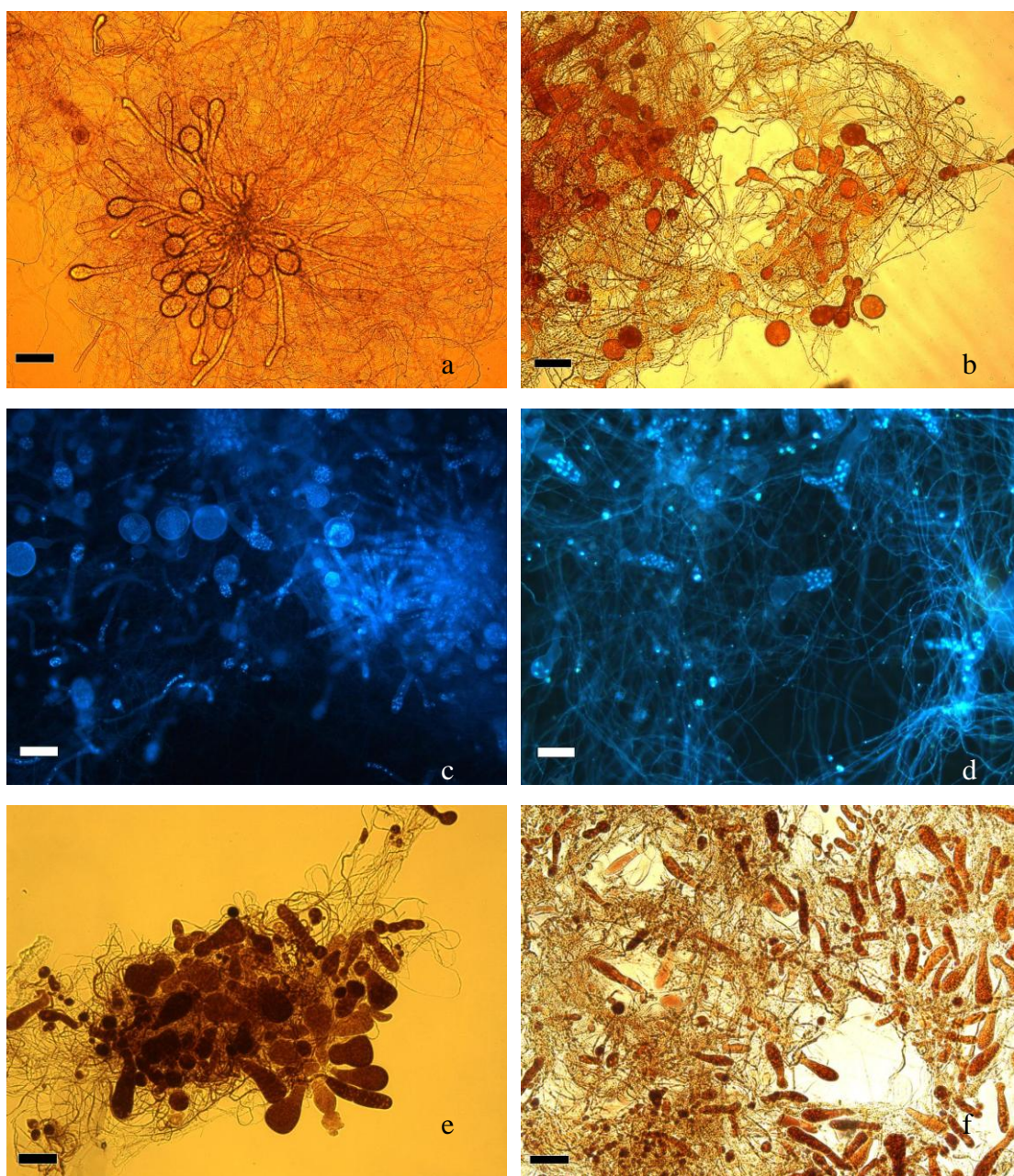
V agaru houba roste prstencovitě a vytváří stejnou strukturou jako bez agaru (obr. 28)



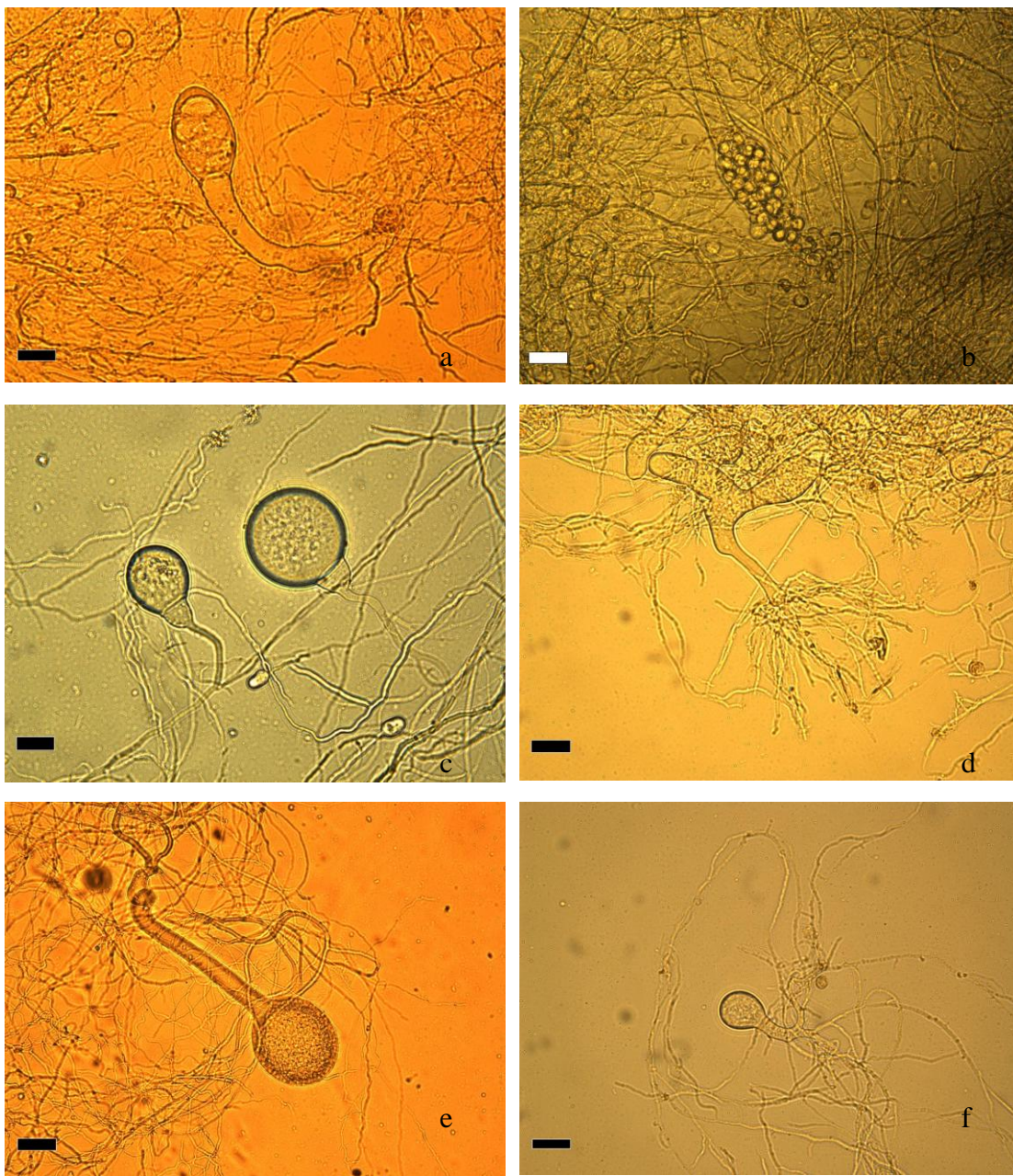
Obr. 28 Kolonie houby KF9 na 1,5 % agaru, úsečka = 100 μm .



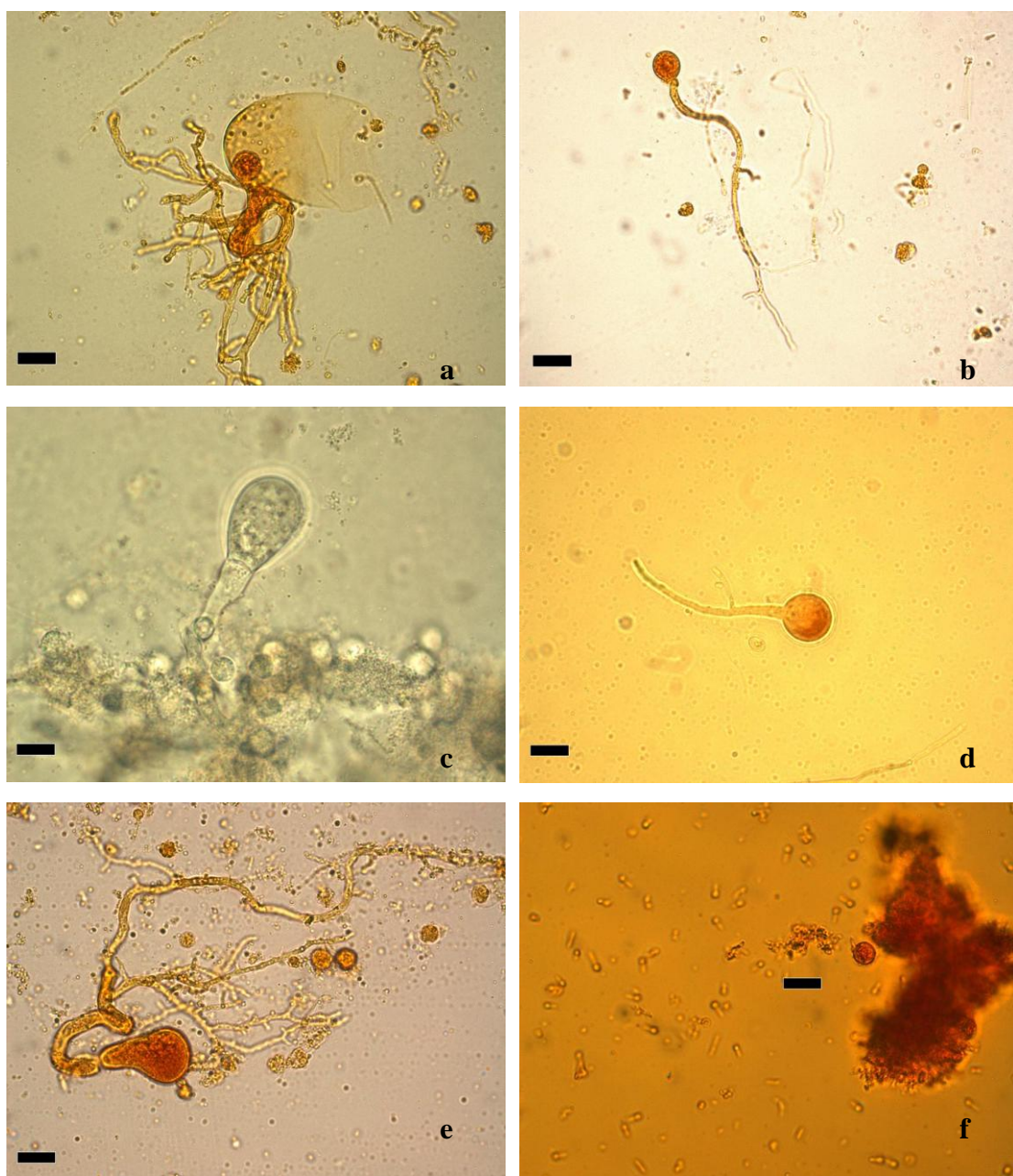
Obr. 29 Mycelium houby KF9 při nárůstu na různých substrátech – cellobiosa (a), filtrační papír (b), MC celulosa (c), xylan (d) a glukosa (e). Úsečka = 100 μm .



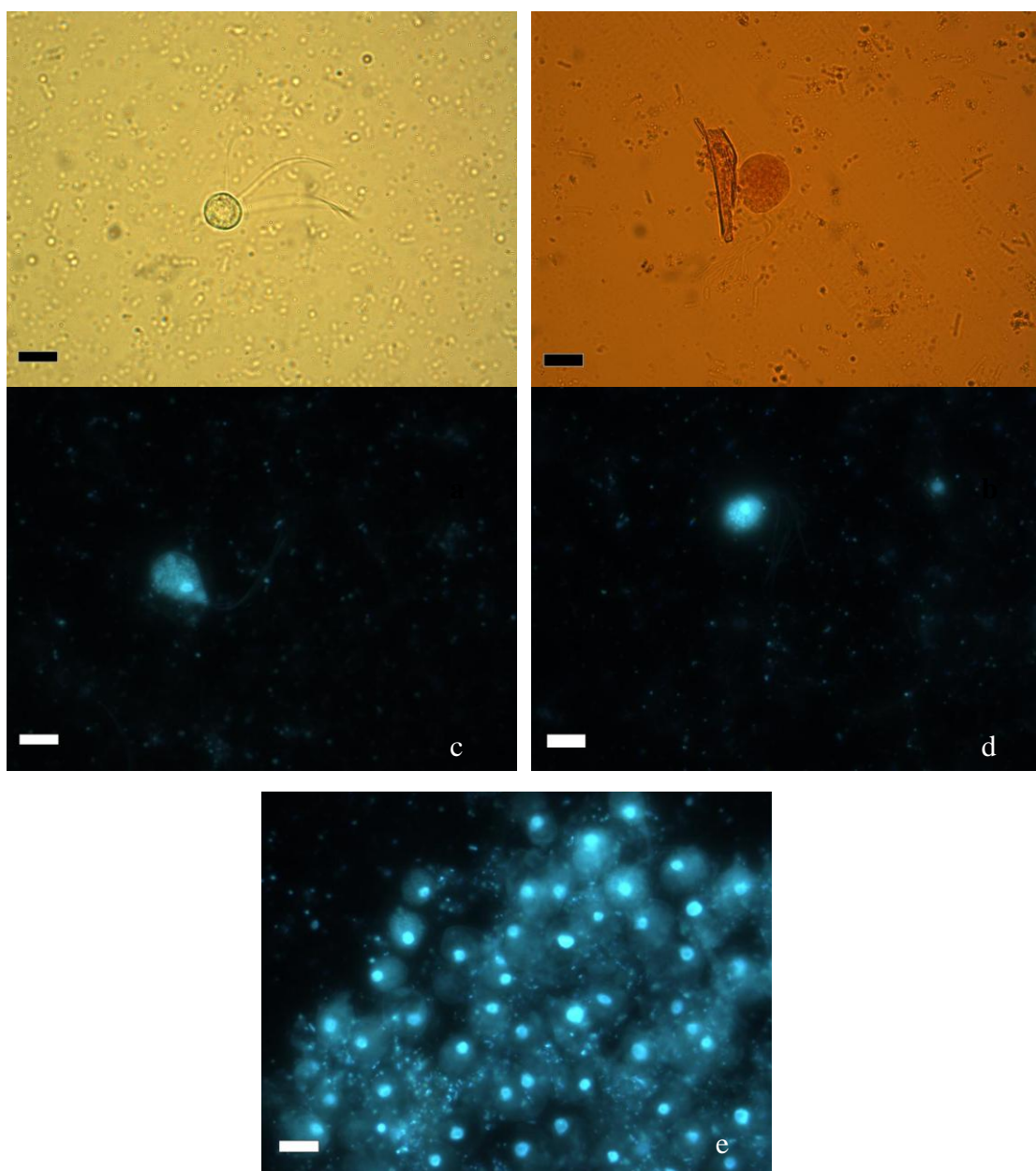
Obr. 30 Mycelium houby KF9. Sporangia se sporangiophory (a), mycelium po 6 hod. nárůstu (b), při fluorescenčním obarvení jader (c, d), sporangia s myceliem po 24 hod. nárůstu (e) a po 48 hod. růstu (f). Úsečka = 50 μm .



Obr. 31 Vznikající sporangium se sporangiophorem po 48 hod. růstu (a), uvolnění zoospor ze sporangia po 48 hod. růstu (b), sporangia se sporangiophory (c, e), vznikající sporangium s narůstajícím myceliem (d, f). Úsečka = 25 μm .



Obr. 32 Prázdné sporangium po uvolnění zoospor (a), klíčící zoospora (b, d), vznikající sporangium se sporangiophorem (c), zaškrcené sporangium s myceliem (e), zoospora v raném stádiu klíčení (f). Úsečka = 10 μm .



Obr. 33 Polybičíkatá zoospora (a,b), polybičíkatá zoospora při fluorescenčním barvení (c, d), skupina zoospor při fluorescenčním barvení (e). Úsečka = 10 μm .

Z morfologického hlediska lze shrnout, že tato houba patří jednoznačně mezi monocentrické rody. Výrazně se liší od monocentrického rodu *Caecomyces*, nelze však jednoznačně říci, zda ji lze přiřadit k rodu *Neocallimastix* či *Piromyces*. Problémem je také výskyt zoospor s různým počtem bičíků. *Piromyces* má jednobičíkaté zoospory, kdežto *Neocallimastix* má polybičíkaté zoospory. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k sekvenční analýze ribozomální DNA.

4.5.2 Sekvenční analýza úseků ribozomální DNA

Z houby KF9 byla izolována genomická DNA a byly amplifikovány úseky malé ribozomální podjednotky pomocí primerů NS1-NS2, velké ribozomální podjednotky pomocí primerů NL1-NL4 a úsek ITS pomocí primerů ITS1-ITS4.

Z této analýzy vyplynulo, že neznámý kmen KF9 patří do čeledi *Neocallimastigaceae*.

Sekvence úseku NS1-NS2 malé ribozomální podjednotky

AAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACAATTCTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA
AATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTACCATTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATA
CATGCGTAAAAACCCGACTTCTGGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAAAACCAACCTGGGCAACCA
GTTTTTTGGTGATTTCATAATAACTTTTCGAATCGTATGACTTTACGTCGACGATGGTTCATTCAAATT
TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTTTAACGGGTAACGGAGAATT
AGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCG
CAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCTACTTTAGTCT
TGTAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCA
CTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG
TTGCGCAGCCTATACGTAC

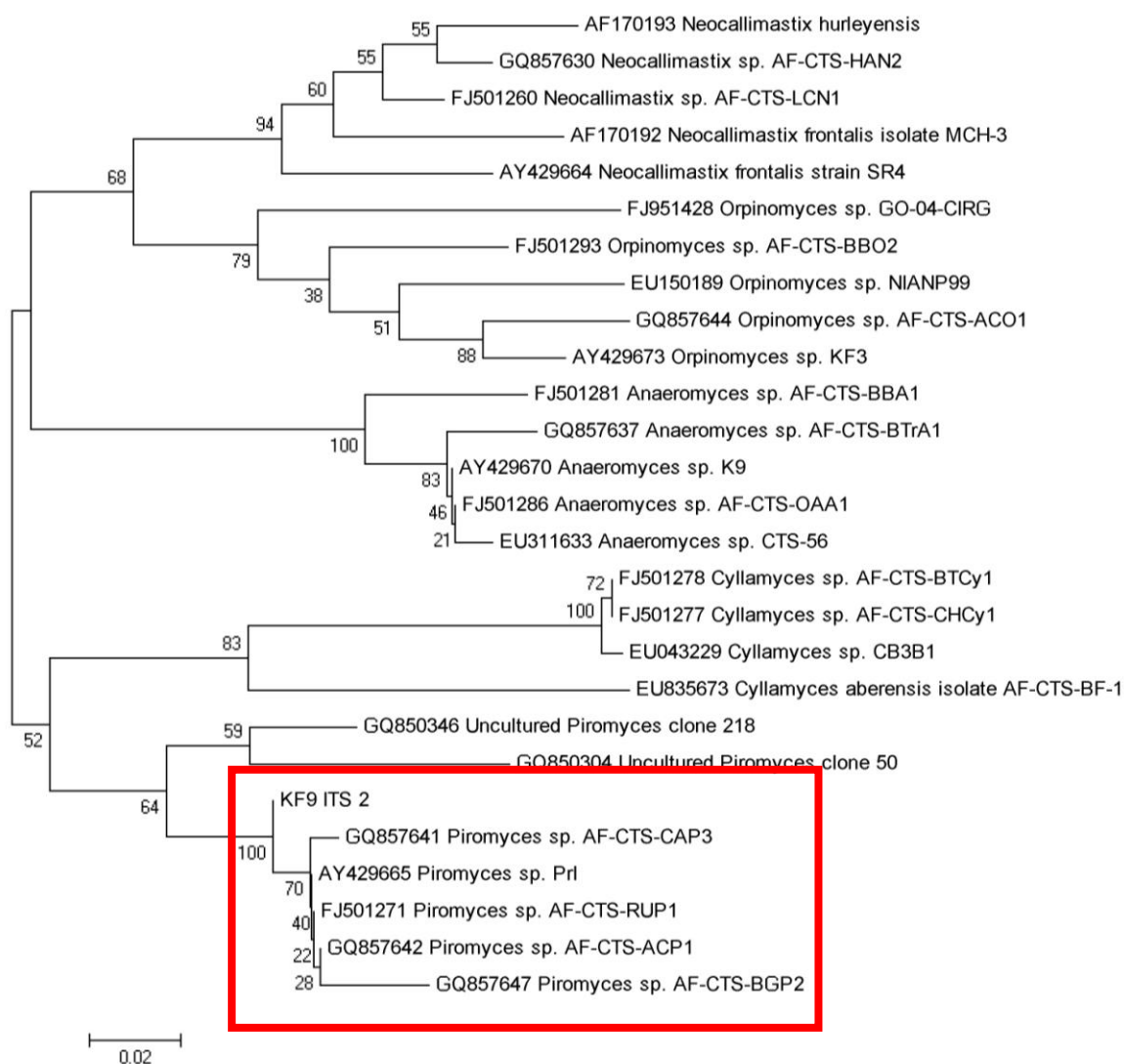
Sekvence úseku NL1-NL4 velké ribozomální podjednotky

ATACTAACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTTCAA
GGTTCTACCTTGACGAATTGTAGTTTAAAGAAGTGTTTTCTGTTAGATGAGTAGCAAAAGTTCCTTG
GAATGGGACATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATTTGGTTATTCATTCTAGCTTTGTGATACACTTT
CAAAGAGTCGGATTGTTTGGGAATGCAGTCCAAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATAT
TGCGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAG
TTAAACAGTACGTGAAATTGTCAAAAGGGAAGCGTTTGACACCAGTGTTGTTTTTCCGAAAATCAA
TTACGAATGGCTTGATTTTGTGTTGTATTGACCTTATCAGCTTTCTGCACTTTTTTCGAGTCTTTCTT
AATGCACTTTTTCGGTAAACAAGCCAACATCAATTTCTTTTGTGTTGTAAGAGTATTCCGGAAGGTGGC
TTTCTTTTTCGGAGAAAGTGTTTATAGCCCTATACTTCTACAATCGGAGAGATTGAGGTCTGCAGCGT
AGATCCTTCGGGGTTAGATACATTTGTGCTAAGTTGTAGCTTTTCATAGACAACCTTGTTGACTATGT
TTAGTCTTGCGGCTTACTCGCTTATGCTATTTTACCTACGCTTAGGATGTTGACAAAATGGTTTTAA
ACGACCCGTC

Sekvence úseku ITS1-ITS4 (internal transcribed spacer)

TCCCTGCCCTTTGTCCACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTSAATCCTTCGGATTGG
 CTTTTTTTTCTGGCAACAGAATTTAATCGCTGAAAAGTTGGGCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAAGTA
 AAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAAATGGCTCGATTTTTTA
 GAGCATTAAATAATCATCTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTTGAATAATTTTTTTTTTAAAATTATTGA
 TGTCTTTCCCTGTTGAATTGGTTGGTCGTAAGACTAAGTGATTCTCAGGGGATAGTCAATAATTTTT
 AAAAAGACCTTTTTTTAAATTAACCTTTTTTGTATTCTWTTKGTCTAAAATTATTTTTATAATATAAA
 AACAACTTTTGACAATGGATCTCTKGGTT

Fylogenetický strom (obr. 34) zpracovaný pro tyto sekvence poukazuje na to, že neznámý kmen KF9 patří do rodu *Piromyces*.



Obr. 34 Fylogenetický strom ITS sekvencí

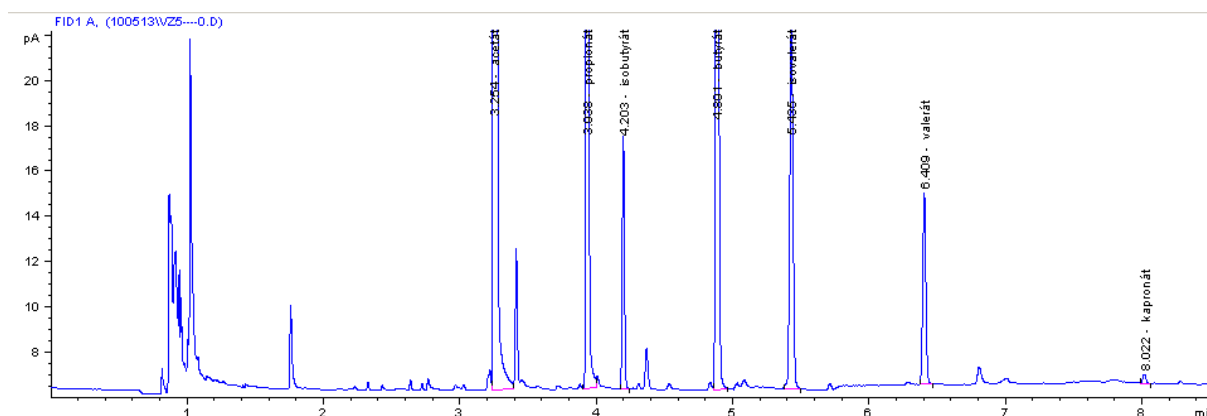
4.5.3 Koncové metabolity

Houba KF9 byla kultivována 4 dny při 39°C v médiu M10. Jako zdroj uhlíku v médiu byl použit xylan, cellobiosa, glukosa a MC-celulosa (4g/l). Médium poté bylo zcentrifugováno 10 min. při 4000 ot/min při 4°C. Hodnoty stanovených koncových fermentačních produktů v supernatantu ukazuje tab. 16. Profil koncových metabolitů u houby KF9 stanovených chromatograficky ukazuje obr. 35.

Tab. 16 Koncové metabolity u neznámé houby KF9 při nárůstu na různých substrátech

Koncové metabolity při nárůstu na různých substrátech (mmol/l)							
	Acetát	Propionát	Isobutyřát	Butyřát	Isovalerát	Valerát	Kapronát
celobiosa	21,93	12,30	2,31	9,70	3,78	1,63	0,14
glukosa	36,59	4,04	0,38	2,83	1,62	0,56	0,00
xylan	37,80	3,58	0,48	2,87	1,94	0,65	0,00
MC-celulosa	6,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

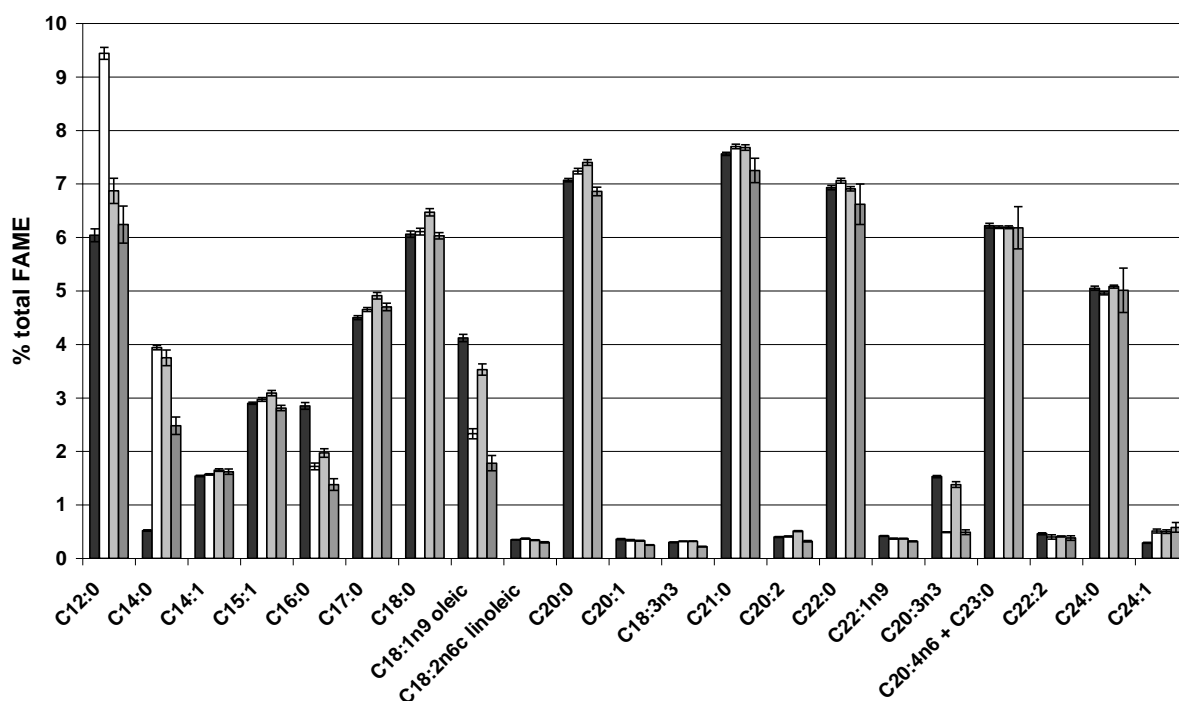
Nejvýznamnější koncový metabolit je acetát na všech substrátech a to v množství 6,53 mmol/l u MC celulosy až 37,80 mmol/l u xylanu. Naopak nejméně zastoupen v koncových metabolitech byl kapronát v množství přibližně 0,1 mmol/l, ten byl však detekován pouze při kultivaci houby na cellobiose. Profil těkavých mastných kyselin se nijak významně neliší od ostatních rodů anaerobních hub.



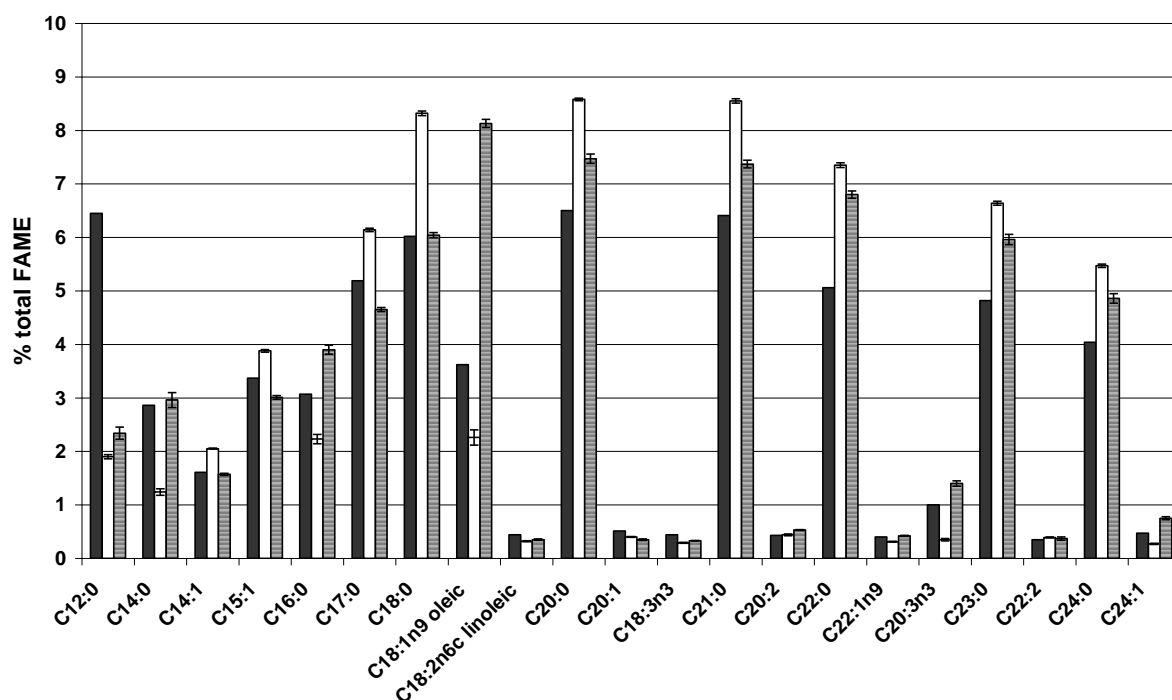
Obr. 35 Profil koncových metabolitů u houby KF9 stanovených chromatograficky.

4.5.4 Složení mastných kyselin v buněčné stěně

Houba KF9 byla kultivována 4 dny v médiu M10 při 39°C. Poté bylo médium zcentrifugováno 10 min. při 4000 ot/min při 4°C. Sediment byl použit pro stanovení složení mastných kyselin. Metyl estery mastných kyselin byly připraveny lipidovou extrakcí a transesterifikací metodou Stahla a Kluga ^[169]. Chromatografické stanovení metyl esterů příslušných mastných kyselin bylo stejným způsobem pro porovnání provedeno také pro houby *Caecomyces* OF1, *Neocallimastix* OF2, *Orpinomyces* KF7 a *Anaeromyces* KF8, JF1, ZF1. Profily mastných kyselin těchto anaerobních hub jsou uvedeny na obrázcích 36 a 37.



Obr. 36 Profily mastných kyselin polycentrických anaerobních hub vyjádřené jako procentuální zastoupení metyl esterů mastných kyselin vzhledem k celkovým mastným kyselinám: *Orpinomyces* KF7 ■, *Anaeromyces* KF8 □, JF1 ■, ZF1 ▨



Obr. 37. Profily mastných kyselin monocentrických anaerobních hub vyjádřené jako procentuální zastoupení metyl esterů mastných kyselin vzhledem k celkovým mastným kyselinám *Neocallimastix* OF2 ■, *Caecomyces* OF1 □, KF9 ▨

Všechny testované kmeny anaerobních hub mají kvalitativně stejný profil mastných kyselin, avšak partneré jsou rozdíly v relativních individuálních koncentracích některých mastných kyselin. Zatímco polycentrické houby rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces* si byly velmi podobné (obr. 35), monocentrické rody se značně lišily (obr. 36). Nový kmen KF9 se přitom lišil výrazně v profilu mastných kyselin jak od rodu *Neocallimastix*, tak i od rodu *Caecomyces*. Kmen KF9 vykazoval výrazně vyšší koncentrace kyseliny olejové (18:1n9c), čímž se významně lišil od všech studovaných rodů anaerobních hub. Bohužel jsme nemohli porovnat profil mastných kyselin s jinou houbou rodu *Piromyces* a v dostupné literatuře nejsou žádné informace tohoto typu k dispozici. Zdá se však, že tento rys může být využit pro taxonomické účely, je však nutno otestovat více kmenů a druhů téhož rodu.

5. DISKUSE

Anaerobní bachorové houby se v posledních letech dostávají do popředí zájmu s cílem pozitivně ovlivnit bachorovou fermentaci u přežvýkavců. Enzymová výbava bachorových anaerobních hub je velice pestrá a účinná, neboť produkují celou škálu hydrolytických enzymů. Mezi nejaktivnější patří celulasy a hemicelulasy, které při interakci s metanogenními bakteriemi vykazují nejvyšší hydrolytické aktivity vůbec ^[191]. Chitinolytické enzymy se dostávají do popředí zájmu až v posledních letech z důvodu využití těchto enzymů při likvidaci chitinu. Protože buněčná stěna anaerobních bachorových hub se skládá z chitinu jako základního stavebního polysacharidu, produkují tyto houby chitinasy, které slouží k formování mycelia a autolyse. Xylanolytické enzymy mají široké uplatnění v biotechnologiích a stále se hledají nové zdroje těchto enzymů s vyšší účinností či stabilitou při vysokých teplotách či v alkalickém prostředí. Z tohoto důvodu byly u anaerobních hub sledovány zejména chitinolytické a xylanolitické enzymy.

Obecně byly hydrolytické enzymy dosud sledovány převážně u monocentrických bachorových hub ^[27, 22, 55, 64, 118], a to především u rodu *Piromyces* a *Neocallimastix*. Značně menší množství údajů bylo dosud publikováno o hydrolytických enzymech hub polycentrických. Z těchto polycentrických hub je pak studován hlavně rod *Orpinomyces*, avšak rod *Anaeromyces* a jeho enzymy jsou novým, dosud neprostudovaným tématem.

Ve své dizertační práci jsem se proto věnovala studiu hydrolytických enzymů se zaměřením na chitinolytický a xylanolytický komplex u anaerobních hub polycentrických rodů *Anaeromyces* a *Orpinomyces*, z monocentrických rodů jsem se zaměřila na velmi málo prostudovaný rod *Caecomyces* a do pokusů byl zařazen i rod *Neocallimastix* a nový dosud nepopsaný kmen anaerobní houby.

Screening hydrolytických enzymů

Nejdříve jsme provedli screening 20 hydrolytických enzymů u hub rodů *Anaeromyces*, *Orpinomyces* a *Caecomyces*. Z výsledků aktivit vyplývá, že houby disponují velkou škálou hydrolytických enzymů. Jako nejvýznamnější enzym se ukázala být endoxylanasa, která dosahovala až 10x vyšších hodnot než jiné enzymy. Toto dokazuje důležitost tohoto enzymu v životě anaerobních hub, neboť hydrolyzuje xylan, který je nejběžnějším typem hemicelulosity.

Vyšší aktivity xylanolytických a celulytických enzymů při nárůstu na celulóse byly popsány i ve studii u houby *Neocallimastix frontalis* a *Piromyces* sp. ^[184,186]. Vyšší aktivity endoxylanasy u houby rodu *Anaeromyces* jsou shodné se studiemi Griffitha et al. ^[75].

Chitinolytický komplex

Chitinolytický komplex byl studován u hub rodu *Anaeromyces* a *Orpinomyces*. Nejvyšších hodnot z celého chitinolytického komplexu, který tvoří endochitinasa, exochitinasa, N-acetylglukosaminidasa, chitin deacetylasa a proteasa, dosahovala endochitinasa. Z tohoto výsledku můžeme vyvodit závěr, že tento enzym je z celého komplexu nejdůležitější. Toto zjištění potvrzuje i studie provedená na anaerobní monocentické houbě rodu *Piromyces* ^[155, 156, 157, 158].

Charakterizace endochitinasy

Teplotní optimum a teplotní stabilita

Endochitinasa u houby rodu *Orpinomyces* měla teplotní optimum a teplotní stabilitu při 50°C, což je stejná teplota jako endochitinasa u *Piromyces communis* OTS1 ^[157]. Na rozdíl od houby rodu *Anaeromyces* s optimální teplotou a stabilitou při 40°C, která je srovnatelná s endochitinasou u *Piromyces communis* OTS1 ^[158].

Obě endochitinasy jsou méně stabilní než endochitinasa v médiu u houby *Piromyces communis* OTS1 ^[157], která byla stabilní až do 70°C, nebo cytosolová endochitinasa u *Piromyces communis* se stabilitou do 60°C ^[156].

pH optimum a pH stabilita

Endochitinasa u obou hub prokazuje pH stabilitu v rozmezí pH 4-7, což je spjato s pH v bacheru přežvýkavců 5-7 ^[126]. Tyto hodnoty jsou podobné hodnotám u houby *Piromyces communis* OTS1 s hodnotami pH 5-8 ^[156]. Optimální pH mají obě houby při pH 6.5, které je srovnatelné s optimálním pH u *Piromyces communis* OTS1 ^[157,158].

Substrátová specifita

Sledovali jsme afinitu endochitinasy u obou hub k různým chitinovým substrátům v intracelulární frakci. Při použití chitinu z houbového mycelia dosahovala endochitinasa nejvyšších aktivit. Námi studované endochitinasy byly schopny rozložit všechny studované

substráty, což ukazuje na jejich širší substrátovou specifitu než u *Piromyces communis* OTS1 [157].

Vliv iontů a chemických látek na aktivitu endochitinasy

Námi zjištěné výsledky odpovídají výsledkům publikovaným pro *Piromyces communis* OTS1 [156,157,158]. Endochitinasa houby rodu *Aneromyces* byla více stimulována působením iontů a chemických látek než endochitinasa houby rodu *Orpinomyces*.

Endochitinasy byly inhibovány působením SDS, což dokazuje nutnost enzymu zaujímat pro svou funkci určitou konformaci. Inhibice pomocí EDTA naznačuje, že by endochitinasy mohly patřit mezi metaloproteiny. Aktivace enzymů pomocí iodoacetamidu a kyseliny iodoctové naznačuje, že se nejedná o cysteinový protein. Aktivace enzymů působením Mg^{2+} vede k domněnce, že tento iont stabilizuje systém zvýšením množství vodných klastrů kolem molekuly proteinu.

Xylanolytický systém

Dynamika endoxylanasy a xylosidasy u anaerobních hub

Na základě sledované dynamiky v aktivitách endoxylanasy a xylosidasy jsme dále používali čtyřdenní kultury anaerobních hub. Tento výsledek odpovídá tomu, že mezi třetím až pátým dnem kultivace se nachází houba v nejvyšší růstové fázi. Ke stejnému výsledku dospěla i studie 5 izolátů anaerobních hub [22] nebo práce o *Neocallimastix frontalis* [163].

Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na zdroji uhlíku v médiu

Studovali jsme produkci endoxylanasy a β -xylosidasy u 4 rodů anaerobních bachorových hub v závislosti na zdroji uhlíku. Změny v expresi endo-1,4- β -xylanasy byly pozorovány technikou vizualizace enzymových aktivit pomocí zymogramů. Enzymová aktivita byla stanovena v závislosti na zdroji uhlíku a buněčné frakci. Endoxylanasa dosahovala nejvyšších hodnot v médiu a β -xylosidasa v buněčné frakci. U rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces* xylosidasová aktivita v buněčné frakci dosahovala 10 krát větších hodnot než v médiu při kultivaci hub na xylanu jako zdroji uhlíku. Na rozdíl od toho u rodu *Neocallimastix* byla aktivita xylosidasy v buněčné frakci pouze 1,2 krát vyšší než v médiu se xyanem. U rodu *Caecomycetes* xylosidasa v buněčné frakci dosahovala vyšších hodnot při růstu na xylanu a glukose, na ostatních substrátech byla nižší. Námi zjištěné výsledky jsou shodné s výsledky u houby *Neocallimastix frontalis* [70], ale rozdílné od hub *Piromyces* a *Caecomycetes* [80].

Zymogramy prokázaly expresi endo-1,4- β -xylanasy v rozdílných izoformách v závislosti na zdroji uhlíku u rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces* a *Caecomyces*, u rodu *Neocallimastix* takové rozdíly nebyly zjištěny. Námi studované houby vytvářely více isoform endoxylanasy než houba *Neocallimastix frontalis* ^[22].

Molekulové hmotnosti isoform endoxylanasy a xylosidasy

Studovali jsme produkci isoform endoxylanasy a β -xylosidasy u 5 rodů hub technikou vizualizace enzymových aktivit pomocí zymogramů. Nejméně aktivních isoform endoxylanasy bylo zjištěno u houby rodu *Anaeromyces* a nejvíce isoform má endoxylanasa u nového izolátu KF9. Jak nejvyšší molekulové hmotnosti 146 kDa, tak i nejmenší molekulové hmotnosti 22 kDa dosahovala isoforma endoxylanasy u houby rodu *Caecomyces*. Endoxylanasy houby rodu *Neocallimastix* OF2 v našem případě měla isoformy o velikosti 34,61,89,127 a 146 kDa, a spoustou méně aktivních bandů. V práci Gomeze de Segury ^[69] extracelulární endoxylanasa vykazovala aktivní bandy velikosti 42, 66, 97, 116, 200 kDa. Nesrovnalost velikostí může být způsobena nepřesností v odečítání velikostí anebo faktem, že v práci Gomeze de Segury ^[69] pracovali s přečištěnou endoxylanasou.

U všech studovaných rodů hub se prokázaly jen 2 aktivní isoformy β -xylosidasy, a to o velikosti 89 a 39 kDa. V práci Garcia-Campayo ^[63] měla přečištěná xylosidasa houby *Neocallimastix frontalis* velikosti bandů 83 a 53 kDa, takže alespoň velikost většího bandu je srovnatelná s našimi výsledky.

Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na buněčné frakci

Studovali jsme enzymové aktivity endoxylanasy a xylosidasy 4 rodů anaerobních hub v 5 buněčných frakcích a 1 extracelulární frakci – médiu. Endoxylanasa dosahovala nejvyšších hodnot u všech hub v médiu, naopak xylosidasa v cytosolové frakci. Nejnižších hodnot dosahovaly oba enzymy v lyzozomální frakci. Toto zjištění plně odpovídá skutečnosti, že houby využívají endoxylanasu k prvotnímu ataku hemicelulose – xylanu a až poté se jednotlivé xylooligosacharidy rozkládají v buňce xylosidasou.

Xylanolytický komplex

Prostudovali jsme celkem 7 enzymů xylanolytického komplexu u 5 rodů anaerobních hub, a to endoxylanasu, β -xylosidasu, acetylxytan esterasy, arabinasu, esterasy kyseliny ferulové, esterasy kyseliny kumarové a α -glukuronidasu. Navíc jsme do studie zahrnuli i enzym α -xylosidasu pro prokázání stereospecifity enzymu. Nejaktivnější enzymy celého

xylanolytického systému se ukázaly být endoxylanasa a β -xylosidasa, které u všech hub dosahovaly nejvyšších aktivit. Opakovaně se prokázalo, že endoxylanasa je produkována extracelulárně a xylosidasa intracelulárně. Naopak nedetekovatelnými enzymy, alespoň při použití dané metody, se ukázaly být esterasa kyseliny ferulové a esterasa kyseliny kumarové. V pracích Bornemana ^[25,26] však naměřili významné hodnoty těchto enzymů, ale tito autoři používali metodu stanovení s využitím substrátů FAXX (O-[5-O-((E)-feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranosa) a PAXX (O-[5-O-((E)-p-coumaroyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranosa) získaných z buněčných stěn rostliny *Cynodon Dactylon* ^[23]. Významných hodnot také dosahovala α -glukuronidasa jako v práci Ushidy ^[197] u houby *Aspergillus niger*, kde použili kyselinu aldobiuronovou jako substrát.

Čistění endoxylanasy pomocí SEPHADEXU G-100 a analýza MALDI-TOF

Endoxylanasu houby *Aneromyces* KF8 jsme se pokusili přechistit pomocí Sephadexu G-100. Xylosidasa vykazovala jeden pík stejně jako v práci Garcia-Campayo ^[63], kde pro přečištění použili Sepharosu a Superosu 6. Endoxylanasa měla mnoho stejně aktivních píků, což je v rozporu s prací Gomeze de Segury ^[69], kde xylanasu po precipitaci síranem amonným přečistili pomocí Ultrogelu AcA 44 a xylanasa měla jen 2 velmi aktivní bandy. Sekvenací MALDI-TOF jsme získali 2 úseky, ale sekvence nebylo možné přiřadit k žádným proteinům dosud dostupným v daných databázích.

Fylogenetická analýza endoxylanasy houby Anaeromyces KF8

Osekvenovali jsme část genu pro xylanasu (Xyn A) u houby rodu *Anaeromyces* KF8 a dalších 8 anaerobních hub se sbírky mikroorganismů ÚŽFG AV ČR. Shoda s dalšími známými endoxylanasami u mikroorganismů, jejichž data jsou dostupná GenBank databázi, jasně dokazuje příbuznost xylanasy s xylanasami ostatních anaerobních hub. Velká fylogenetická analýza zahrnující 194 sekvencí pak naznačila zajímavou příbuznost endoxylanasy anaerobních hub s endoxylanasami bakteriálními.

Popis nové houby KF9

Z kravské bachorové tekutiny jsme vyizolovali houbu KF9, která svou morfologií kolísala mezi druhem *Piromyces* a *Neocallimastix* ^[67, 84, 85, 109]. Sekvenční analýza úseků rDNA potvrdila, že nový izolát patří z hlediska genetického do rodu *Piromyces* ^[63, 79, 80, 103]. V současné fázi ale nejsme schopni vysvětlit přítomnost jak mono- tak i polybičíkatých

zoospor. U všech dosud popsaných anaerobních hub je pro daný rod i druh typický výskyt buď vícebičíkatých zoospor, a to s počtem 12 až 20 bičíků pro jednu zoosporu, nebo jednobíčíkatých zoospor (výstižnějším výrazem by pravděpodobně byl pojem málobíčíkatých zoospor), neboť právě v případě rodu *Piromyces* mohou mít zoospory až čtyři bičíky. Můžeme tedy pouze spekulovat, zda se u nového druhu anaerobní houby popsaného v této práci vyskytují obě varianty zoospor nebo jde o kokulturu dvou nových druhů anaerobních hub, které nelze rozizolovat klasickými mikrobiologickými metodami.

Houba KF9 produkovala acetát jako hlavní fermentační produkt, který je běžný u všech anaerobních hub ^[146]. Avšak analýza profilu mastných kyselin buněčné stěny houby KF9 prokázala, že tato houba se liší od všech studovaných kmenů hub, výjimečná byla zejména vysokou produkcí kyseliny olejové. Výskyt lipidů v buněčné stěně představuje užitečnou biochemickou charakteristiku, která se u hub používá k taxonomickým účelům ^[107, 194, 74, 169, 16, 49]. Pro anaerobní houby je tento přístup zatím omezený velmi malým množstvím informací. Naše práce: I.Koppová, Z.Novotná, L.Štrosová, K.Fliegerová. 2008. Analysis of fatty acid composition of anaerobic rumen fungi. *Folia Microbiologica* 53: 217-220 přináší první informace o kompozici mastných kyselin v buněčné stěně anaerobních hub.

6. ZÁVĚR

Výsledky získané při řešení dizertační práce dokazují, že cíle byly splněny. Předkládaná práce významně přispívá k objasnění výbavy anaerobních hub hydrolytickými enzymy u rodů *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix* a *Caecomyces*.

Výsledky diplomové práce lze shrnout následujícím způsobem:

- 1, Nejaktivnějším hydrolytickým enzymem se ukázala být u všech rodů hub endoxylanasa a to s aktivitami až 10x vyššími než jiné enzymy.
- 2, Měřitelnou aktivitu vykazovala z celého chitinolytického systému u rodů *Orpinomyces* a *Anaeromyces* pouze endochitinasa, ostatní složky měly zanedbatelné hodnoty aktivit.
- 3, Byla charakterizována endochitinasa u rodu *Orpinomyces* a *Anaeromyces* v různých buněčných frakcích a v médiu a byly stanoveny její fyzikálně-chemické vlastnosti, a to optimální pH a teplota, vliv pH a teploty na stabilitu enzymu, substrátová specifita a vliv chemikálií a iontů na funkci enzymu. Námi zjištěné vlastnosti enzymu jsou podobné vlastnostem endochitinasy jiných anaerobních bavorových hub.
- 4, Nejvyšších hodnot dosahovala endoxylanasa a xylosidasa u hub rodu *Caecomyces*, *Anaeromyces* a *Orpinomyces* mezi třetím až sedmým dnem.
- 5, Aktivita endoxylanasy a xylosidasy v závislosti na zdroji uhlíku v kultivačním médiu dosahovala u hub rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix* a *Caecomyces* nejvyšších hodnot při použití xylanu jako zdroje uhlíku, naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny při použití arabinosy.
- 5, Endoxylanasa u hub rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix* a *Caecomyces* existuje v několika isoformách o molekulové hmotnosti mezi 22 a 146 kDa. Xylosidasa u těchto hub existuje ve dvou isoformách o molekulových hmotnostech 39 a 89 kDa.
- 6, Při proměření aktivit endoxylanasy a xylosidasy v různých buněčných frakcích a médiu u hub rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces* a *Caecomyces* dosahovala endoxylanasa nejvyšších hodnot v médiu a xylosidasa v cytosolové frakci.
- 7, Z celého xylanolytického systému u hub rodu *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix* a *Caecomyces* se jako nejaktivnější enzym ukázala být v extracelulární frakci endoxylanasa a v intracelulární frakci xylosidasa.
- 8, Snaha o purifikaci endoxylanasy a xylosidasy pomocí SEPHADEXU G-100 u houby rodu *Anaeromyces* se ukázala být úspěšná u xylosidasy, nikoliv u endoxylanasy. Proto byl pro

analýzu MALDI-TOF použit nepřečistěný vzorek. Analýza MALDI-TOF nám dokázala osekvenovat jen dva krátké úseky.

9, Fylogenetická analýza endoxylanasy u houby rodu *Anaeromyces* dokázala příbuznost s endoxylanase hub rodů *Neocallimastix* a *Piromyces*.

10, Při popisu nového izolátu KF9 se naskytl problém se získáním čistého kmene. I když izolát KF9 vystupoval jako jedna entita, zoospory se vyskytovaly jak mono, tak polybičíkaté, což ukazuje zřejmě na směs dvou hub. I přesto jsme se pokusili o popis této směsi hub, neboť nešlo houby od sebe rozizolovat. Houba však nakonec byla zařazena do rodu *Piromyces*.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Albersheim, P., Killias, U.: Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. Arch Biochem Biophys 97, 107-115 (1962)
- [2] Andrade, S. V., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.: Effect of carbon source on the biochemical properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. Process Biochem 39, 1931-1938 (2004)
- [3] Araújo, J. H. B., Moreas, F. F., Zanin, G. M.: Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. Appl Biochem Biotechnol 77-79, 713-722 (1999)
- [4] Aristidou, A., Penttillä, M.: Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. Curr Opin Biotechnol 11, 187-198 (2000)
- [5] Asoa, N., Ushida, K., Kojima, Y.: Proteolytic activity of rumen fungi belonging to the genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. Lett Appl Microbiol 16, 247-250 (1993)
- [6] Bajpai, P.: Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog 15, 147-157 (1999)
- [7] Barichievich, E. M., Calza, R. E.: Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. Appl Environ Microbiol 56, 43-48 (1990)
- [8] Barr, D. J. S.: An outline for the classification of the *Chytridiales*, and for a new order, the *Spizellomycetales*. Can J Bot 58, 2380-2394 (1980)
- [9] Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K. J.: Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix sp.*, *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. Can J Bot 67, 2815-2824 (1989)
- [10] Bataillon, M., Cardinali, A. P. N., Castillon, N., Duchiron, F.: Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus sp.* strain SPS-0. Enzyme Microb Technol 26, 187-192 (2000)
- [11] Bauchop, T., Mountfort, D. O.: Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. Appl Environ Microbiol 42, 1103-1110 (1981)
- [12] Bauchop, T.: The gut anaerobic fungi: colonizers of dietary fibre, v knize Fibre in human and animal nutrition, (Wallace, G., Bell, L. eds.) Royal Soc N Zealand Wellington, 143-148 (1982)
- [13] Bayer, E. A., Morag, E., Lamed, R.: The cellulosome- a treasure-trove for biotechnology. Trends Biotechnol 12, 379-386 (1994)
- [14] Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G. S.: Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. Enzyme Microb Technol 27, 459-466 (2000)
- [15] Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S.: Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol 56, 326-338 (2001)
- [16] Bentivenga, S. P., Morton, J. B.: Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigasporaceae*. Proc Natl Aca Sci 93, 5659-5662 (1996)
- [17] Bhat, M. K.: Cellulases and related enzymes in biotechnology. Botechnol Adv 18, 355-383 (2000)
- [18] Bidochka, M. J., Tong, K. I., Khachatourians, G. G.: Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Can J Microbiol 39, 40-45 (1992)

- [19] Biely, P.: Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol 3, 286-290 (1985)
- [20] Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D.: Endo- α -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. J Biotechnol 57, 151-166 (1997)
- [21] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99 (1987)
- [22] Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G.: Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. Appl Environ Microbiol 55, 1066-1073 (1989)
- [23] Borneman, W. S., Hartley, R. D., Himmelsbach, D. S., Ljungdahl, L. G.: Assay for trans-p-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. Anal Biochem 190, 129-133 (1990)
- [24] Borneman, W. S., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G.: Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. Appl Microbiol Biotechnol 33, 345-351 (1990)
- [25] Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E.: Isolation and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic *Neocallimastix* strain MC-2. Appl Environ Microbiol 57, 2337-2344 (1991)
- [26] Borneman, W. S., Ljungdahl, L. G., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E.: Purification and partial characterization of 2 feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. Appl Environ Microbiol 58, 3762-3766 (1992)
- [27] Borneman, S., Akin, D. E.: The nature of anaerobic fungi and their polysaccharide degrading enzymes. Mycoscience 35, 199-211 (1994)
- [28] Bradford, M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 72, 247-254 (1976)
- [29] Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., Gouet, Ph.: Morphological and metabolic characterisation of new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. FEMS Microbiol Lett 58, 309-314 (1989)
- [30] Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J.: *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp., A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. FEMS Microbiol Lett 70, 177-182 (1990)
- [31] Brownlee, A. G.: Properties of chitin synthetase from a rumen anaerobic fungus. Abstract of XIV International Congress of Microbiology, 1-19 (1986)
- [32] Brühlmann, F., Leupin, M., Erismann, K. H., Fiechter, A.: Enzymatic degumming of ramie bast fibers. J Biotechnol 76, 43-50 (2000)
- [33] Buchert, J., Ranua, M., Kantelinem, A., Viikari, L.: The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of kraft pulp. Appl Microbiol Biotechnol 37, 825-829 (1992)
- [34] Cabib, E., Bowers, B.: Fungal cell wall synthetis: the construction of a biological structure. Microbiological Sciences 5(12), 370-375 (1988)
- [35] Caldwell, D. R., Bryant, M. P.: Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl Microbiol 14, 794-801 (1966)
- [36] Calza, R. E.: Nascent synthetis and secretion of cellobiase in *Neocallimastix frontalis* EB188. Curr Microbiol 23, 175-180 (1991a)

- [37] Camacho, N. A., Aguilar, O. G.: Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus sp.* and its application in bakery. *Appl Biochem Biotechnol* 104, 159-172 (2003)
- [38] Chavez, R., Schachter, K., Navarro, C., Peirano, A., Aguirre, C., Bull, P., Eyzaguirre, J.: Differences in expression of two endoxylanase genes (xynA and xynB) from *Penicillium purpurogenum*. *Gene* 293 (1-2), 161-168 (2002)
- [39] Chen, Y.-C., Tsai, S.-D., Cheng, H.-L., Chien, C.-Y., Hu, C.-Y., Cheng, T.-Y.: *Caecomycetes sympodialis* s.nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*. *Mycologia* 99(1), 125-130 (2007)
- [40] Christov, L. P., Prior, B. A.: Esterases of xylan-degrading microorganisms, production, properties and significance. *Enzyme Microb Technol* 15, 460-475 (1993)
- [41] Christov, L. P., Szakacs, G., Balakrishnan, H.: Production, partial characterization and use of fungal cellulose-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochem* 34, 511-517 (1999)
- [42] Christov, L., Biely, P., Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Prior, B. A., Bhat, M. K.: Effects of purified endo- β -1,4-xylanases of family 10 and 11 and acetyl xylan esterases on eucalypt sulfite dissolving pulp. *J Biotechnol* 83, 231-244 (2000)
- [43] Coscerton, J. W., Greese, G. G., Vheng, K. J.: How bacteria stick. *Sci Am* 238, 86-95 (1978)
- [44] Coughlan, M. P., Hazlewood, G. P.: β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 17, 259-289 (1993)
- [45] Crepin, V. F., Fauld, C. B., Connerton, I. F.: Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 63 (6), 647-652 (2004)
- [46] Csiszár, E., Urbánszki, K., Szakás, G.: Bitreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *J Mol Catal B Enzym* 11, 1065-1072 (2001)
- [47] de Vries, R. P., Kester, H. C., Poulsen, C. H., Benen, J. A., Visser, J.: Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr Res* 327 (4), 401-410 (2000)
- [48] Dekker, R. F. H., Riccards, G. N.: Purification, properties and mode of action of hemicellulase-produced by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydr Res* 39, 97-114 (1975)
- [49] Devi P., Divya Shridhar, M. P., D'Souza, L., Naik, C. G.: Cellular fatty acid composition of marine-derived fungi. *Indian J Mar Sci* 35, 359-363 (2006)
- [50] Doi, R. H., Goldstein, M., Hashida, S., Park, J. S., Takagi, M.: The *Clostridium cellulovorans* collulosome. *Crit Rev Microbiol* 20, 87-93 (1994)
- [51] Doi, R. H., Park, J. S., Liu, C. C., Malburg, L. M., Tamaru, Y., Ichiishi, A., Ibrahim, A.: Cellulosome and noncellulosome cellulases of *Clostridium cellulovorans*. *Extremophiles* 2 (2), 53-60 (1998)
- [52] Doi, R. H., Tamaru, T.: The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem Rec* 1 (1), 24-32 (2001)
- [53] Doi, R. H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., Han, S. O.: Cellulosomes from mesophilic bacteria. *J Bacteriol* 185, 5907-5914 (2003)
- [54] Doi, R. H., Kosugi, A.: Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol* 2 (7), 541-551 (2004)

- [55] Douglas, O. M., Asher, R. A.: Production of α -amylase by the Ruminant Fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl Environ Microbiol 54(9), 2293-2299 (1988)
- [56] Eadie, J. M.: The development of the rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J Gen Microbiol 29, 263-278 (1962)
- [57] Ebringerová, A., Heinze, T.: Xylan and xylan derivatives- biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. Macromol Rapid Commun 21, 542-556 (2000)
- [58] Fernández-Espinar, M., Piñaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramón, D., Vallés, S.: Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. Appl Microbiol Biotechnol 42, 555-562 (1994)
- [59] Fliegerová, K., Hodrová, B., Voigt, K.: Classical and Molecular Approaches as a Powerful Tool for the Characterization of Rumen Polycentric Fungi. Folia Microbiol 49, 157-164 (2004)
- [60] Flores, M. E., Perea, M., Rodríguez, O., Malvárez, A., Huitron, C.: Physiological studies on induction and catabolic repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. J Biotechnol 49, 179-187 (1996)
- [61] Flint, H. J., Zhang, J. X., Martin, J.: Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. Curr Microbiol 29, 139-143 (1994)
- [62] Funaguma, T., Naito, S., Morita, M., Okumara, M., Sugiura, M., Hara, A.: Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. Agric Biol Chem 55, 1163-1165 (1991)
- [63] Garcia-Campayo, V., Wood, T. M.: Purification and characterisation of a β -D-xylosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. Carbohydrate Research 242, 229-245 (1993)
- [64] Gerbi, C., Bata, J., Breton, A., Prensier, G.: Polysaccharide hydrolase production by the rumen fungus *Caecomyces communis*. Res Microbiol 147, 363-370 (1996)
- [65] Georis, J., Giannotta, F., de Buyl, E., Granier, B., Frère, J.-M.: Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulp. Enzyme Microb Technol 26, 178-186 (2000)
- [66] Ghosh, M., Nanda, G.: Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49. FEMS Microbiol Lett 117, 151-156 (1994)
- [67] Gold, J. J., Heath, I. B., Bauchop, T.: Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomyces equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the *Neocallimasticaceae*. Mol Microbiol 6, 403-415 (1988)
- [68] Gomes, D. J., Gomes, J., Steiner, W.: Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. J Biotechnol 33, 87-94 (1994)
- [69] Gomez de Segura, B., Fevre, M.: Purification and characterization of two 1,4- β -xylan endohydrolases from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl Environ Microbiol 59(11), 3654-3660 (1993)
- [70] Gomez de Segura B., Durand, R., Fevre, M.: Multiplicity of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS Microbiol Lett 164, 47-53 (1998)
- [71] Gooday, G. W.: Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation 1, 177-190 (1990)

- [72] Gordon, G. L. R., Phillips, M. W.: Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix sp.* LM1: a rumen anaerobic fungus. *Lett Appl Microbiol* 15, 113-115 (1992)
- [73] Gottschalk, G.: Bacterial metabolism. 2nd edn. Springer Berlin Heidelberg New York (1985)
- [74] Graham, J. H., Hodge, N. C., Morton, J. B.: Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Appl Environ Microbiol* 61, 58-64 (1995)
- [75] Griffith, G. W., Oskoze, E., Theodorou, M. K., Davies, D. R.: Diversity of anaerobic fungal population in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecol* 2, 87-97 (2009)
- [76] Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., Zupancic, S.: Production of fungal xylanases. *Bioresour Technol* 58, 137-161 (1996)
- [77] Harbak, L., Thygesen, H. V.: Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. *Food Chem Toxicol* 40, 1-8 (2002)
- [78] Hasegawa, H., Nagel, C. W.: Isolation of an oligogalacturonate hydrolase from a *Bacillus species*. *Arch Biochem Biophys* 124, 513-520, (1968)
- [79] Heath, B., Bauchop, T., Skipp, R. A.: Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the *Spizellomycetales* (*Chytridiomycetes*) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can J Bot* 61, 295-307 (1983)
- [80] Hébraud, M., Fèvre, M.: Characterization of glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *J Gen Microbiol* 134, 1123-1129 (1988)
- [81] Hébraud, M., Fèvre, M.: Purification and characterization of a specific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol* 56, 3164-3169 (1990)
- [82] Henrissat, B., Bairoch, A.: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293, 781-788 (1993)
- [83] Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O., Huhndorff, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., JStalpers, A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K., Köljalb, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Mialikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, R., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schuessler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M., Winka, K., Yao Y.-J., Zhang N.: A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111, 509-547 (2007)
- [84] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Mycotaxon* 47, 285-293 (1993)
- [85] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Piromyces spiralis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of goat. *Mycotaxon* 48, 59-68 (1993)
- [86] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. *Mycotaxon* 46, 241-258 (1993)
- [87] Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H.: *Anaeromyces*, an earlier name for *Ruminomyces*. *Mycotaxon* 47, 283-284 (1993)

- [88] Hobson, P. N.: Rumen microorganisms. *Prog Ind Microbiol* 9, 42-77 (1971)
- [89] Hrmová, M., Petraková, E., Biely, P.: Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme system in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *J Gen Microbiol* 137, 541-547 (1991)
- [90] Hungate, R. E.: The rumen and its microbes. Academic Press, London (1966)
- [91] Hungate, R. E.: A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes, v knize *Methods in microbiology* 3B, (Norris, J. R., Ribbons, D. W. eds) Academic Press, London, 117-132 (1969)
- [92] Ito, K., Ogassawara, J., Sugimoto, T., Ishikawa, T.: Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawashii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 547-550 (1992)
- [93] Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G.: Cereal arabinoxylans: advances in structure and physiochemical properties. *Carbohydr Polym* 28, 33-48 (1995)
- [94] Joblin, K. N.: Isolation enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl Environ Microbiol* 42, 1119-1122 (1981)
- [95] Kafetzopoulos, D., Martinou, A.: Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2564-2568 (1993)
- [96] Kalendová, A., Kovářová, N.: Výskyt anaerobních hub v trávicím traktu býložravců, Masarykova střední škola chemická
- [97] Kaneko, S., Shimasaki, T., Kusakabe, I.: Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Biosci Biotechnol Biochem* 57, 1161-1165 (1993)
- [98] Kauss, H., Bauch, B.: Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology* 161, 518-523 (1988)
- [99] Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Makino, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K.: Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1230-1237 (2000)
- [100] Kopečný, J., Wallace, R. J.: Cellular location and some properties of proteolytic enzyme of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* 43, 1026-1033 (1982)
- [101] Kopečný, J., Hodrová, B.: Chitinolytic enzymes in the rumen microbial ecosystem. *Scientific Symp. „Animal Microbiology“* Domžale, Slovenia, 85-93 (1998)
- [102] Krátký, J.: Studium anaerobních bacherových hub. Vysoká škola zemědělská v Praze, Fakulta agronomická, Obor zootechnický, Katedra veterinárních disciplín (1991)
- [103] Kulkarni, N., Rao, M.: Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *J Biotechnol* 51, 167-173 (1996)
- [104] Kulkarni, N., Lakshmikumar, M., Rao, M.: Xylanase II from a alkaliphilic thermophilic *Bacillus* with distinctly different structure from other xylanases, evolutionary relationship to alkaliphilic xylanases. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 640-645 (1999a)
- [105] Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M.: Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 23, 411-456 (1999b)
- [106] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

- [107] Lechevalier, H., Lechevalier, M.P.: Chemotaxonomic use of lipids, v knize Microbial lipids (Vol.1), (Ratledge, C., Wilkinson S.G. (Eds.) Academic Press Ltd, London, 869-902 (1988)
- [108] Lever, M.: Carbohydrate Determination with 4-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide (PAHBAH): Effect of Bismuth on the reaction. Analytical Biochemistry 81, 21-27 (1977)
- [109] Li, J., Heath, I. B., Bauchop, T.: *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycets fungi from the hind-gut of the horse and elephant. Can J Bot 68, 1021-1033 (1990)
- [110] Li, X. L., Chen, H., Ljungdahl, L. G.: Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce related cellulases and xylanases. Appl Environ Microbiol 63, 628-635 (1997)
- [111] Liu, W., Lu, Y., Ma, G.: Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. Process Biochem 34, 67-72 (1999)
- [112] Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. J Gen Microbiol 133, 1829-1834 (1987)
- [113] Lowe, S. E., Griffith, G. G., Milne, A., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: The life-cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. J Gen Microbiol 133, 1751-1758 (1987)
- [114] Lowe, S. E., Theodorou, M.K., Trinci, A. P. J.: Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. Appl Environ Microbiol 53, 1210-1215 (1987b)
- [115] Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. Appl Environ Microbiol 53, 1216-1223 (1987c)
- [116] Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M. J., Bosse, M., Egmond, M. R., Hagemans, M. L. D., van Gorcom, R. F. M., Hessing, J. G. M., van den Hondel, C. A. M. J. J., van Rotterdam, C.: Xylanases and their applications in bakery, v knize Xylans and xylanases, (Visser J., Beldman G., Someren Kusters-van M.A., Voragem A.G.J. eds.) Elsevier, Amsterdam, 349-360 (1992)
- [117] Mach, R. L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M., Kubicek, C. P.: Carbon catabolite repression of xylanase U xyn1 gene expression in *Trichoderma reesei*. Mol Microbiol 216, 1273-1281 (1996)
- [118] McSweeney, C. S., Dulieu, A., Katayama, Y., Lowry, J. B.: Solubilization of lignin by the Ruminant Anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. Appl Environ Microbiol 60(8), 2985-2989 (1994)
- [119] Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F., Gouet, P.: In vitro study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. FEMS Microbiol Lett 110, 5-10 (1993)
- [120] Mill, P. J., Tuttobello, R.: The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 2. Endopolygalacturonase. Biochem J 79, 57-64 (1961)
- [121] Milne, A., Theodorou, M. K., Jordan, M. G. C., King-Spooner, C., Trinci, A. P. J.: Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva, and in pure culture. Exp Mycol 13, 27-37 (1989)
- [122] Mishra, C., Kesar, S., Rao, M.: Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*. Appl Environ Microbiol 48, 224-228 (1984)
- [123] Moroseli, R., Durand, S., Letendre, E.: Induction of xylanase by β -methylxyloside in *Cryptococcus albidus*. FEMS Microbiol Lett 48, 261-266 (1987)

- [124] Mountfort, D. O., Asher, R. A.: Production of α -amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl Environ Microbiol 54, 2293-2299 (1988)
- [125] Mountfort, D. O., Asher, R. A.: Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl Environ Microbiol 55, 1016-1022 (1989)
- [126] Mrázek, J.: Charakterizace anaerobních hub pomocí klasických a molekulárně genetických metod: Diplomová práce FPBT VŠCHT, ústav biochemie a mikrobiologie, 3-30 (2000)
- [127] Munn, E. A., Orpin, C. G., Greenwood, C. A.: The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic chytridiomycete fungi from the rumen of sheep. BioSystems 21, 67-82 (1988)
- [128] Munn, E. A.: The ultrastructure of anaerobic fungi, v knize Anaerobic fungi: Biology, Ecology and Function, (Mountfort, D. E., Orpin, C. G. eds.) Marcel Dekker, New york, 47-106 (1994)
- [129] Müller, M.: The hydrogenosome, v knize The eukaryotic microbial cell, (Gooday, G. W., Lloyd, D., Trinci, A. P. J. eds.) Cambridge University Press, Cambridge, 127-142 (1980)
- [130] Novozámská, K. MVDr.: Úvod do studia bachorových hub: Práce kandidátského minima, Československá akademie věd, Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat (1988)
- [131] O'Fallon, J. V., Wright, R. W., Calza, R. E.: Glucose metabolic pathway in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. Biochem J 274, 595-599 (1991)
- [132] Orpin, C. G.: The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur?. J Gen Microbiol 84, 395-398 (1974)
- [133] Orpin, C. G.: Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J Gen Microbiol 91, 249-262 (1975)
- [134] Orpin, C. G.: Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. J Gen Microbiol 94, 270-280 (1976)
- [135] Orpin, C. G.: The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life-history and invasion of plant material in the rumen. J Gen Microbiol 99, 107-117 (1977)
- [136] Orpin, C. G.: On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. J Gen Microbiol 101, 181-189 (1977)
- [137] Orpin, C. G.: The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organism *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. J Gen Microbiol 99, 215-218 (1977)
- [138] Orpin, C. G., Bountiff, L.: Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. J Gen Microbiol 101, 113-122 (1978)
- [139] Orpin, C. G., Greenwood, Y.: Effects of haems and related compounds on growth and zoosporogenesis of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis* H8. J Gen Microbiol 132, 2179-2185 (1986)
- [140] Orpin, C. G., Munn, E. A.: *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the *Neocallimasticeae* inhabiting the rumen of sheep. Trans Br Mycol Soc 86, 178-181 (1986)
- [141] Orpin, C. G., Joblin, K. N.: The rumen anaerobic fungi., v knize The rumen microbial ecosystem, (Hobson, P.N. eds.) Elsevier Applied Science, London, 129-150 (1988)

- [142] Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., Theodorou, M. K.: *Cyllumyces aberensis* gen.nov. sp.nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Can J Bot* 79, 666-673 (2001)
- [143] Patel, R. N., Grabski, A. C., Jefries, T. W.: Chromophore release from kraft by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 405-412 (1993)
- [144] Pearce, P. D., Bauchop, T.: Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl Environ Microbiol* 49, 1265-1269 (1985)
- [145] Phillips, M. W., Gordon, G. L. R.: Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *BioSystems* 21, 377-383 (1988)
- [146] Phillips, M. W., Gordon, G. L. R.: Carbohydrate fermentation by three species of polycentric ruminal fungi from cattle and water buffalo in tropical Australia. *Anaerobe* 1, 41-47 (1995)
- [147] Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorin, D. S.: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 577-591 (2005)
- [148] Prade, R. A.: Xylanases, from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 101-131 (1995)
- [149] Puls, J., Schuseil, J.: Chemistry of hemicelluloses, relationship between hemicelluloses structure and enzyme required for hydrolysis, v knize Hemicelluloses and hemicellulases, (Cougland, M. P., Hazlewood, G. P.eds) Portland Press, London, 1-27 (1993)
- [150] Rani, D. S., Nand, K.: Production of thermostable cellulose-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochem* 36, 355-362 (2000)
- [151] Reilly, P. J.: Xylanases: Structure and function. *Basic Life Sci* 18, 111-129 (1981)
- [152] Rizzatti, A. C. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V., Polizeli, M. L. T. M.: Purification and properties of a thermostable extracellular β -xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotech* 26, 156-160 (2001)
- [153] Rizzatti, A. C. S., Sandrim, V. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M.: Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzyme of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotech* 31, 88-93 (2004)
- [154] Sahai, A. S., Manocha, M. S.: Chitinas of fungi and plants: their involment in morphogenesis and hostparasite interaction. *FEMS Mikrobiology Reviews* 11, 317-338 (1993)
- [155] Sakurada, M., Morgavi, D. P.: Chinolytic activity of the anaerobic rumen fungus *P. communis* OTS1. *Current Microbiology* 31, 206-209 (1995)
- [156] Sakurada, M., Morgavim D. P.: Purification and characteristics of cytosolic chitinase from *Piromyces communis* OTS. *FEMS Microbiology Letters* 137, 75-78 (1996)
- [157] Sakurada, M., Morgavim D. P.: Purification and characteristic of an Autolytic chitinase of *P.communis* OTS1 from culture medium. *Current Microbiology* 35, 48-51 (1997)
- [158] Sakurada, M., Morgavi, D. P.: Purification and characteristics of membrane bound chitinase of anaerobic ruminal fungus *P.communis* OTS1. *Current microbiology* 37, 60-63 (1998)

- [159] Salles, B. C., Medeiros, R. G., Bão, S. M., Silva, F. G. Jr., Filho, E. X. F.: Effect of cellulose-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. *Process Biochem* 40 (1), 343-349 (2005)
- [160] Sandrim, V. C., Rizzatti, A. C. S., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Milagres, A. M. F., Polizeli, M. L. T. M.: Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem* 40 (5), 1823-1828 (2005)
- [161] Sapag, A., Wouters, J., Lambert, C., de Ioannes, P., Eyzaguirre, J., Depiereux, E.: The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J Biotechnol* 95, 109-131 (2002)
- [162] Screenath, H. K., Jeffries, T. W.: Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. *Bioresour Technol* 72, 253-260 (2000)
- [163] Segura, B. G., Durand, R., Fèvre, M.: Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol Lett* 164 (1), 47-53 (1998)
- [164] Shah, A. K., Sidid, S. S., Ahmad, A., Rele, M. V.: Treatment of bagasse pulp with cellulose-free xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Sam-3. *Bioresour Technol* 68, 133-140 (1999)
- [165] Slapack, G. E., Russel, I., Stewart, G. G.: *Thermophilic microbes in ethanol production*. CRC press, Boca Raton FL (1987)
- [166] Simão, R. C. G., Souza, C. G. M., Peralta, R. M.: The use of methyl β -D-xyloside as a substrate for xylanase production by *Aspergillus tamarii*. *Can J Microbiol* 43, 56-60 (1997a)
- [167] Simão, R. C. G., Souza, C. G. M., Peralta, R. M.: Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl β -D-xyloside. *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 267-271 (1997b)
- [168] Smith, D. C., Bhat, K. M., Wood, T. M.: Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 7, 475-484 (1991)
- [169] Stahl, P. D., Klug, M. J.: Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol* 62, 4136-4146 (1996)
- [170] Stamatakis, A.: RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690 (2006)
- [171] Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R.: *General microbiology*, 5th edn. Macmillan Education, London (1987)
- [172] Subramaniyan, S., Prema, P.: Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 183, 1-7 (2000)
- [173] Subramaniyan, S., Prema, P.: Biotechnology of microbial xylanases, enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* 22, 33-64 (2002)
- [174] Sunna, A., Antranikian, G.: Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17, 39-67 (1997)
- [175] Sung, W. L., Luk, C. K., Chan, B., Wakarchuk, W., Yaguchi, M., Campbell R., Willick, G., Ishikawa, K., Zahab, D. M.: Expression of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride* xylanases in *Escherichia coli*. *Biochem Cell Biol* 73(4-6), 253-259 (1995)
- [176] Takenishi, S., Tsujisaka, Y.: Structure of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*. *Agric Biol Chem* 37, 1385-1391 (1973)

- [177] Tamaru, Y., Doi, R. H.: Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4125-4129 (2001)
- [178] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739 (2011)
- [179] Tan, L. U. L., Wong, K. K. Y., Yu, E. K. C., Saddler, J. N.: Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol* 7, 425-430 (1985)
- [180] Taneja, K., Gupta, S., Kuhad, R.C.: Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour Technol* 85 (1), 39-42 (2002)
- [181] Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K.: Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem* 38, 1327-1340 (2003)
- [182] Tenkanen, M., Viikari, L., Buchert, J.: Use of acid-tolerant xylanase for bleaching of kraft pulps. *Biotechnol Tech* 1112, 935-938 (1997)
- [183] Tenkanen, M., Siika-aho, M.: An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J Biotechnol* 78 (2), 149-161 (2000)
- [184] Teunissen, M. J., Smits, A. A. M., Op den Camp, H. J. M., Huis in't Veld, J. H. J., Vogel, G. D.: Fermentation of cellulose and production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivores. *Arch Microbiol* 156, 290-296 (1991)
- [185] Teunissen, M. J., Op Den Camp, H. J. M., Orpin, C. G., Huis in't Veld, J. H. J., Vogels, G. D.: Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. *J of General Microbiology* 137, 1401-1408 (1991a)
- [186] Teunissen, M. J., Baerends, R. J. S., Knelissen, R. A. G., Op den Camp, H. J. M., Vogel, G. D.: A semi-continuous culture system for production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 28-33 (1992)
- [187] Teunissen, M. J., De Kort, G. V. M., Op Den Camp, H. J. M., Vogels, G. D.: Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores on different substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 39/40, 177-189 (1993)
- [188] Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J.: Procedures for the isolation and culture if anaerobic fungi, v knize The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion, (Nolan, J. V., Leng, R. A., Demeyer, D. I., eds) Penambul books, Armidale, New South Wales, 145-152 (1989)
- [189] Theodorou, M. K., Gill, M. K., King, Spooner, C., Beever, D. E.: Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: a novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 56, 1073-1078 (1990)
- [190] Theodorou, M. K., Lowe, S. E., Trinci, A. P. J.: Anaerobic fungi and the rumen ecosystem, v knize The fungal community: its organization and role in the ecosystem, 2nd edn., (Carroll, G. C., Wicklow, D. T. eds.) Marcel Dekker, New York, 43-72 (1992)
- [191] Theodorou, M. K.: Biochemistry and Ecology of Anaerobic Fungi. *The Mycota* VI, 265-295 (1996)
- [192] Törrönen, A., Rouvinen, J.: Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *J Biotechnol* 57, 137-149 (1997)

- [193] Trinci, A. P. J., Davies, D. R., Gull, K., Lawrence, M. I., Nielsen, B. B., Rickers, A., Theodorou, M. K.: Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol Res* 98, 129-152 (1994)
- [194] Tunér, K., Baron, E. J., Summanen, P., Finegold, S. M.: Cellular fatty acid in *Fusobacterium* species as a tool for identification. *J Clin Microbiol* 30(12), 3225-3229 (1992)
- [195] Turunen, O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmaanperä, J., Wu, X., Rouvinen, J., Leisola, M.: A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism. *J Biotechnol* 88, 37-46 (2001)
- [196] Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., Pethick, D. W.: The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Anim Feed Sci Technol* 108 (1-4), 71-82 (2003)
- [197] Uchida, H., Nanri, T., Kawabata, Y., Kusakabe, I., Murakami, K.: Purification and characterization of intracellular β -glucuronidase from *Aspergillus niger* 5-16. *Biosci Biotech Biochem* 56(10), 1608-1615 (1992)
- [198] Uffen, R.L.: Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19, 1-6 (1997)
- [199] van Peij, N. N. M. E., Brinkmann, J., Vrsanská, M., Visser, J., de Graaff, L. H.: β -xylosidase activity, encoded by xlnD, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. *Eur J Biochem* 245, 164-173 (1997)
- [200] Viikari, L., Sundquist, J., Kettunen, J.: Xylanase enzymes promote pulp bleaching. *Paper Timber* 73, 384-389 (1991)
- [201] Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M.: Xylanases in bleaching, from idea to the industry. *FEMS Microbiol Rev.* 13, 335-350 (1994)
- [202] Wallace, R. J., Joblin, N. J.: Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol Lett* 29, 19-25 (1985)
- [203] Warner, A. C. I.: Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diets once day. *J Gen Microbiol* 45, 213-235 (1966)
- [204] Webb, J., Theodorou, M. K.: A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. *BioSystems* 21, 393-401 (1988)
- [205] Webb, J., Theodorou, M. K.: *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov., an anaerobic fungus from the ovine rumen. *Can J Bot* 69, 1220-1224 (1991)
- [206] Whistler, R.L., Richards, E.L.: Hemicelluloses, v knize The carbohydrates, (Pigman, W., Horton, D. eds.) Academic Press, New York, 447-469 (1970)
- [207] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, v knize PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. eds.): Academic Press, New York, 315-322 (1990)
- [208] Whitmire, D., Miti, B.: Xylanases effects on pulp delignification. *Chem Eng Commun* 189 (5), 608-622 (2002)
- [209] Williams, A. G., Orpin, C. G.: Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can J Microbiol* 33, 418-426 (1987a)

- [210] Williams, A. G., Orpin, C. G.: Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrates. *Can J Microbiol* 33, 427-434 (1987b)
- [211] Wirth, S. J., Wolf, G. A.: Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J Microbiol Meth* 12, 1997-2005 (1990)
- [212] Williamson, G., Faulds, C. B., Kroon, P. A.: Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. *Biochem Soc Trans* 26 (2), 205-209 (1998)
- [213] Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., Saddler, J. N., Yagushi, M.: Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* 32, 570-574 (1986)
- [214] Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., Saddler, J. N.: Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. *Microbiol Rev* 52 (3), 305-317 (1988)
- [215] Wong, K. K. Y., Saddler, J. N.: Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, v knize Hemicelluloses and hemicellulases, (Coughlan, M. P., Hazlewood, G. P. eds) Portland Press, London, 127-143 (1993)
- [216] Whistler, R. L., Richards, E. L.: Hemicelluloses, v knize The carbohydrates, (Pigman, W., Horton, D. eds.) Academic Press, New York, 447-469 (1970)
- [217] Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett N. C., Greenwood, C. A.: Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J* 236, 359-364 (1986b)
- [218] Zanoelo, F. F., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.: Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *J Ind Microbiol Biotech* 31, 170-176 (2004)

Svoluji k zapůjčení této dizertační práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena řádně evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka